

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

**IMPLICATION DE LA VOIE DU RÉTICULUM ENDOPLASMIQUE DANS
L'APOPTOSE INDUITE PAR L'ACROLÉINE**

**MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE
(CONCENTRATION BIOCHIMIE)**

PAR

YULIA ZILBER

DÉCEMBRE 2009

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement n°8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

À ma famille adorée

À Louenas, l'amour de ma vie

À mes parents

À Anna et Val

REMERCIEMENTS

L'accomplissement de ce travail ne serait pas possible sans l'aide et le soutien de plusieurs personnes. J'aimerais remercier tous ces gens.

J'aimerais remercier mes collègues de laboratoire avec lesquels j'ai partagé plusieurs moments précieux durant mon parcours. Merci à Catherine Lauzon et à Julie Roy pour leur temps, leurs nombreux encouragements et leur compréhension. Un merci très spécial à Ahmed Bettaieb pour son aide sans limite dans la réalisation de plusieurs expériences présentées dans le présent mémoire ainsi que pour sa patience. Merci également à Pragathi Pallepathi pour son aide dans la réalisation des expériences.

J'aimerais exprimer une grande reconnaissance à toute ma famille. J'aimerais surtout remercier mon mari qui a su me donner les bons conseils et qui m'a supportée tout au long de ce travail. Un grand merci pour mes parents Tatyana et Moishé pour leur sacrifice, leur courage et leur amour. Vous êtes une source d'inspiration pour moi. Un merci à ma sœur Anna et mon frère Val pour votre présence éternelle, pour votre aide et pour votre amour. Je vous adore.

Finalement, j'aimerais remercier les organismes CIHR (Title of Proposal: Induction of apoptosis by the toxic aldehyde acrolein; grant holder: Prof. Diana A. Averill-Bates, grant number: MOP-74489) et CRSNG pour le support financier.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	ix
RÉSUMÉ.....	xv
CHAPITRE I. INTRODUCTION.....	1
1.1 Acroléine.....	1
1.1.1 Introduction.....	1
1.1.2 Historique et généralités.....	2
1.1.3 Sources d'exposition humaine	4
1.1.4 Stabilité de l'acroléine dans l'environnement.....	9
1.1.5 Métabolisme de l'acroléine.....	9
1.1.6 Mécanismes de toxicité de l'acroléine : interactions avec les macromolécules biologiques	10
1.1.6.1 Formation des adduits au niveau de l'ADN.....	10
1.1.6.2 Formation des adduits au niveau des acides aminés des protéines.....	14
1.1.6.3 Interaction avec les groupements thiols et modulation de la signalisation d'oxydoréduction par l'acroléine	16
1.1.7 Pathologies associées à l'acroléine.....	23
1.1.8 Induction de la mort cellulaire par l'acroléine	28
1.2 Apoptose	30
1.2.1 Introduction.....	30
1.2.2 Voies de signalisation de l'apoptose.....	32
1.2.2.1 Voie des récepteurs de mort.....	32
1.2.2.2 Voie mitochondriale	35
1.2.2.3 Voie du réticulum endoplasmique.....	39

1.2.2.2	Voie mitochondriale	35
1.2.2.3	Voie du réticulum endoplasmique	39
1.2.2.3.1	Stress du réticulum endoplasmique	39
1.2.2.3.2	Réponse UPR et survie cellulaire	40
1.2.2.3.3	Réponse UPR et apoptose.....	45
1.3	Présentation du projet	50
1.3.1	Introduction.....	50
1.3.2	Modèle cellulaire	52
1.3.3	Objectifs spécifiques.....	54
1.3.4	Approches expérimentales.....	55
CHAPITRE II MATÉRIEL ET MÉTHODES.....		58
2.1	Culture cellulaire.....	58
2.2	Traitement des cellules A549 avec l'acroléine	58
2.3	Étude morphologique de l'apoptose par le marquage avec le Hoechst 33258 en microscopie à fluorescence.....	60
2.4	Détection de l'apoptose par marquage à l'annexine V-FITC en cytométrie de flux... 61	
2.5	Étude de l'activité enzymatique des caspases et des calpaïnes par fluorimétrie	63
2.6	Étude de l'expression totale des protéines par immunobuvardage	64
2.7	Détection du Ca^{2+} libre cytosolique par marquage au fluo-3 en cytométrie de flux... 66	
2.8	Analyses statistiques.....	67
CHAPITRE III RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.....		68
3.1	Préface	68
3.2	Résultats	68

3.2.1 L'acroléine induit l'apoptose dans les pneumocytes A549.....	68
3.2.2 L'acroléine induit la signalisation UPR dans les cellules A549.....	71
3.2.3 L'implication de la voie du RE dans la transduction du signal apoptotique dans les cellules A549.....	73
3.3 Figures	76
3.3 Titres et légendes des figures.....	86
CHAPITRE IV DISCUSSION.....	91
CHAPITRE V CONCLUSION.....	107
RÉFÉRENCES.....	110

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 :	Formule développée de l'acroléine.....	4
Figure 1.2 :	Formation endogène de l'acroléine.....	8
Figure 1.3 :	Métabolisme de l'acroléine.....	11
Figure 1.4 :	Formation des adduits d'acroléine au niveau de l'ADN.....	12
Figure 1.5 :	Réactions de l'acroléine avec les acides aminés des protéines.....	15
Figure 1.6 :	Le cycle d'oxydoréduction du GSH et de la Trx.....	17
Figure 1.7 :	Modulation de la signalisation d'oxydoréduction par l'acroléine....	19
Figure 1.8 :	Interaction entre la voie du récepteur de mort et la voie mitochondriale.....	34
Figure 1.9 :	Les protéines de la famille de Bcl-2 sont divisées en trois groupes fonctionnels qui diffèrent par leur composition en domaines d'homologie de Bcl-2 (BH).....	36
Figure 1.10 :	La signalisation UPR.....	41
Figure 1.11 :	L'induction de l'apoptose par le stress fort et prolongé du RE.....	42
Figure 3.1 :	L'acroléine induit la condensation de la chromatine des cellules A549.....	76
Figure 3.2 :	L'acroléine induit l'externalisation de la PS dans les cellules A549	77
Figure 3.3 :	L'acroléine induit l'activation de la caspase 7 et induit le clivage d'ICAD.....	78
Figure 3.4 :	L'acroléine active les trois branches de la réponse UPR.....	79
Figure 3.5 :	L'acroléine perturbe l'homéostasie calcique.....	81
Figure 3.6 :	L'acroléine induit un clivage de la calpastatine et cause l'activation des calpaïnes.....	82
Figure 3.7 :	Mécanisme d'activation des caspases 12 et 4 par l'acroléine.....	83
Figure 3.8 :	La chélation du calcium et l'inhibition des calpaïnes protègent les cellules A549 contre l'apoptose induite par l'acroléine.....	84

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 : Sources d'émission de l'acroléine.....	5
--	---

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

AARE	<i>Amino acid response element</i>
Ac	Acétyl
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AFC	7-amino-4-trifluorométhylcoumarin
AIF	Facteur inducteur d'apoptose
AMC	7-amino-4-méthylcoumarin
ANT	Translocase de nucléotides adényliques
AP-1	Protéine activatrice-1
Apaf-1	Facteur activateur de protéase apoptotique-1
Apo2L/TRAIL	Apoptosis ligand 2/tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARE	<i>Antioxidant response element</i>
ASK1	<i>Apoptosis signal-regulated kinase 1</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATF6	<i>Activating transcription factor 6</i>
ATF4	<i>Activation transcription factor 4</i>
ATP	Adénosine triphosphate
Bad	Antagoniste de mort cellulaire de Bcl-2
Bak	Antagoniste/tueur homologue à Bcl-2
BAPTA-AM	<i>1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetrakis(acetoxymethyl ester)</i>
Bax	Protéine X associée à Bcl-2
Bcl-2	Lymphome de cellules B de type 2
Bcl-XL	Lymphome de cellules B extra long
Bcl-w	<i>Bcl-2-like 2</i>

BH	Domaine d'homologie à Bcl-2
Bid	Agoniste de mort interagissant par domaine BH3
Bip	<i>Immunoglobulin heavy chain-binding protein</i>
BIR	<i>Baculoviral IAP repeat</i>
BSA	Albumine de sérum bovin
bZIP	Domaine de type glissière à leucine
CAD	Nucléase activée par les caspases
CARD	<i>Caspase-recruitment domains</i>
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer binding proteins</i>
CHAPS	<i>3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-2-hydroxy-1-propanesulfonique acide</i>
CHOP	C/EBP protéine homologue
cPLA ₂	Phospholipase A ₂ calcium-dépendante
Cyt c	Cytochrome c
dATP	Désoxyadénosine triphosphate
DBS	Tampon salin de Dulbecco
DD	<i>Death domain</i>
DcR	<i>Decoy Receptor</i>
DED	Domaine effecteur de mort
Smac/DIABLO	Protéine liante de l'IAP avec un dérivé de la mitochondrie activateur de caspase
DISC	Complexe inducteur de signal de mort
DMEM	Milieu Eagle's modifié par Dulbecco
DNase	Déoxyribonucléase
DNP	2,4-Dinitrophényl
DR	Récepteur de mort
DTT	Dithiotréitol
EBSS	<i>Earle's balanced salt solution</i>
eIF2 α	<i>Eukaryotic translation initiation factor2α</i>
eIF2B	Facteur échangeur de nucléotides de guanine
EDEM	<i>ER degradation-enhancing α-mannosidase-like protein</i>
EDTA	<i>Éthylène diamine tetraacetic acid</i>

EGTA	<i>Éthylene glycol tetraacetic acid</i>
ERAD	Dégradation associée au réticulum endoplasmique
ERK	Kinase régulatrice du signal extracellulaire
ERO1	<i>ER oxydoreductine 1</i>
ERSE	<i>ER stress response element</i>
FACS	Cytomètre de flux
FADD	Protéine associée au domaine de mort de Fas
FasR	Récepteur associé au fibroblaste
FasL	Fas Ligand
FBS	Sérum fœtal bovin
FHC	<i>Ferritin Heavy Chain</i>
FITC	Fluorescéine isothiocyanate
c-FLIP	<i>Cellular FLICE-inhibitory protein</i>
Fluo-3-AM	Fluo-3-acétoxyméthyl ester
FMK	<i>Fluoromethyl ketone</i>
GADD34	Arrêt de croissance et dommage à l'ADN
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GFP	Protéine verte fluorescente
GRP	<i>Glucose regulated protein</i>
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion disulfide
GST	Glutathion S-transférase
HBE1	Cellules épithéliales bronchiques humaines
HDL	Lipoprotéine à haute densité
HEPES	<i>(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)</i>
HNE	4-hydroxy-2-nonéanal
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HRP	Peroxydase de raifort
HtrA2/Omi	Protéine A2 haute température requise / endoprotéase régulée par le stress
HUVEC	Cellules humaines endothéliales de la veine ombilicale

IAP	Protéine inhibitrice de l'apoptose
ICAD	Inhibiteur de la nucléase activée par les caspases
I κ B	<i>Inhibitor of kappa light chain gene enhancer in B cells</i>
IKK	I κ B kinase
IL-8	Interleukine-8
INF- γ	Interféron gamma
InoP ₃	Inositol-(1,4,5)-triphosphate
IRE1	Inositol requis 1
JNK	<i>c-Jun NH₂-terminal kinase</i>
Keap 1	<i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>
kcat	Nombre de turnover
K _m	Constante de Michaélis
LDL	<i>Lipoprotéine de faible densité</i>
MAPK	Protéines kinases activées par mitogènes
MAP3K	MAP kinase kinase kinase
MAP2K	MAP kinase kinase
MCA	(7-Méthoxycoumarin-4-yl)acétyl
α -MEM	Milieu essentiel minimum alpha
MDA	Malondialdéhyde
MnSOD	<i>Manganese Superoxide Dismutase</i>
MOPS	<i>3-(N-morpholino)-propane sulfonic acid</i>
MPOC	Maladie pulmonaire obstructive chronique
MRP	<i>Multidrug Resistant Protein</i>
NF- κ B	Facteur nucléaire- κ B
pNA	p-Nitroanilide
NO	Oxyde nitrique
Nrf2	<i>Nuclear erythroid-2 related factor 2</i>
NRS	Espèces réactives d'azote
OH	Radical hydroxyle
α -OH-PdG	3H-6-hydroxy-3-(β -D-2'-désoxyribofuranosyl)-5,6,7,8-tetrahydropyrido[3,2-a]purin-9-one

γ -OH-PdG	3 <i>H</i> -8-hydroxy-3-(β -D-2'-désoxyribofuranosyl)-5,6,7,8-tetrahydropyrido[3,2- <i>a</i>]purin-9-one
OMM	Membrane mitochondriale externe
uORF	<i>Upstream open reading frame</i>
ORF	<i>Open reading frame</i>
PARP	PolyADP-ribose polymérase
PBS	Tampon phosphate salin
PBR	Récepteur périphérique des benzodiazépines
PdG	1, <i>N</i> ² -(1,3-propano)-2'-désoxyguanosine
PDI	Protéine disulfide isomérase
PERK	<i>PKR-like ER kinase</i>
PI	Iodure de propidium
PIPES	<i>Piperazine-N-N-bis-(2-ethanesulfonic acid)</i>
ppb	Particules par billion
ppm	Particules par million
PS	Phosphatidylsérine
PTP	Pore de perméabilité transitoire mitochondrial
PUMA	p53-upregulated modulator of apoptosis
PVDF	Polyvinylidène difluoride
RE	Réticulum endoplasmique
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
ROCK I	Sérine/thréonine kinase associée à Rho kinase I
S1P	Site-1 protéase
S2P	Site-2 protéase
SDS	Sodium dodécyl sulphate
SDS-PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante
SEM	Erreur standard de la moyenne
SIDA	Syndrome d'immuno-déficience acquise
tBid	Agoniste de mort interagissant par domaine BH3 tronqué
TNF	Facteur de nécrose tumorale
TNFR	Récepteur du facteur de nécrose tumorale

TRADD	Protéine associée au TNFR1 avec un domaine de mort
TRAF2	Facteur 2 associé au TNFR
Trx	Thioredoxine
Trx(SH) ₂	Thioredoxine réduite
TrxSS	Thioredoxine oxydée
TUNEL	<i>TdT-mediated-dUTP nick end-labelling</i>
UPR	<i>Unfolded protein response</i>
UPRE	<i>Unfolded protein response element</i>
VDAC	Canal anionique voltage dépendant
VLDL	Lipoprotéine de très faible densité
XBP1	<i>X Box-binding protein 1</i>
XIAP	Protéine inhibitrice de l'apoptose liée au chromosome X
Z-ATAD-FMK	<i>Z-Ala-Thr-Ala-Asp(OMe)-fluoromethyl ketone</i>
Z-LEVD-FMK	<i>Z-Leu-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-fluoromethyl ketone</i>
$\Delta\psi_m$	Potentiel membranaire mitochondrial
$\lambda_{\text{émission}}$	Longueur d'onde d'émission
$\lambda_{\text{excitation}}$	Longueur d'onde d'excitation

RÉSUMÉ

L'acroléine est un aldéhyde α,β -insaturé, très électrophile, auquel l'être humain est exposé dans plusieurs situations. Ce composé toxique est un polluant environnemental qui est principalement présent dans les produits de la combustion de la matière organique tels que la fumée de cigarette, les gaz d'échappement et les vapeurs des huiles de cuisson. De façon endogène, l'acroléine est produite lors d'un stress oxydatif et d'une inflammation ce qui suggère qu'elle est impliquée dans plusieurs pathologies telles que les maladies neurodégénératives, respiratoires et l'insuffisance rénale. L'acroléine réagit rapidement avec plusieurs sites nucléophiles de la cellule et forme ainsi des adduits au niveau de l'ADN et des protéines et favorise la peroxydation des lipides. La réaction de l'acroléine avec le glutathion ainsi que les cystéines de plusieurs enzymes résulte en une perturbation de la balance d'oxydoréduction de la cellule ce qui perturbe plusieurs voies de signalisation cellulaire dont la voie apoptotique. L'implication de l'acroléine dans la mort cellulaire a été démontrée dans les études précédentes sans pour autant détailler les mécanismes moléculaires dans les cellules pulmonaires A549. Le but de ce travail est d'étudier l'implication du réticulum endoplasmique (RE) dans la transduction du signal apoptotique induit par l'acroléine (25-200 μ M) dans les cellules d'adénocarcinome humain A549. Notre étude montre que l'acroléine (25-200 μ M) induit la réponse apoptotique des cellules A549. Plus précisément, l'acroléine cause un stress du RE et induit ainsi la réponse aux protéines à conformations anormales (UPR) qui se traduit par la phosphorylation des kinases PERK et IRE1 α ainsi que par le clivage de l'ATF6 α . Cependant l'activation de la réponse UPR n'a pas induit l'expression de Bip. De plus, la réponse UPR, induite par un traitement de 2h avec l'acroléine, n'est pas en mesure d'exercer son effet de survie ce qui résulte en l'initiation de la voie pro-apoptogène. Nos résultats indiquent que l'apoptose induite par l'acroléine implique l'induction du facteur de transcription CHOP, l'augmentation du taux de calcium libre intracellulaire qui est responsable de l'activation des calpaïnes qui à leur tour sont impliquées dans l'activation des caspases 12 et 4. Nous avons également montré que le chélateur de calcium BAPTA-AM ainsi que l'inhibiteur des calpaïnes protègent les cellules A549 contre l'apoptose induite par l'acroléine. Toutefois, les inhibiteurs des caspases 12 et 4 n'ont pas montré un effet significatif. Dans le cas de la caspase 4, son inhibition cause une inhibition partielle (non significative) de l'apoptose. Ceci peut suggérer l'implication d'autres voies dans la transduction du signal apoptotique induit par l'acroléine dans les cellules pulmonaires A549. Nos observations suggèrent que le processus apoptotique induit par l'acroléine peut être médié par la voie du RE mais n'implique pas nécessairement l'activation des caspases 12 et 4. Cette étude révèle de nouveaux aspects sur les mécanismes de toxicité de l'acroléine.

MOTS CLÉS : Acroléine, apoptose, caspase, réticulum endoplasmique.

CHAPITRE I. INTRODUCTION

1.1 Acroléine

1.1.1 Introduction

Encore aujourd'hui, la fumée de cigarette continue à être la cause première de maladie et de décès évitables dans le monde. Cette année, plus de cinq millions de personnes (dont 45 000 au Canada) mourront prématurément à cause du tabagisme (Illing et Kaiserman, 2000; WHO, 2008). Les études épidémiologiques montrent que la mortalité associée à la consommation de tabac est principalement attribuable aux maladies cardiovasculaires, maladies pulmonaires ainsi qu'aux cancers dont celui du poumon (Ezzati et Lopez, 2004; Hoffmann *et al.*, 1997; Hoffmann *et al.*, 2001). Il est à noter que les effets toxiques de la cigarette touchent également les non-fumeurs qui sont exposés à la fumée secondaire. En 2005, la prévalence du tabagisme étaient de 20% regroupant plus de cinq millions de Canadiens âgés de 15 ans et plus (Santé Canada, 2005). Même si ce taux est en baisse depuis 1985, le tabagisme demeure un important problème de santé. Au Canada, plus de 17 milliards de dollars ont été dépensé, en 2002, dans la gestion des coûts reliés aux maladies causées par le tabagisme. La plus grande partie de cette dépense (12,5 millions de dollars) est associée à la perte de productivité due à la maladie et aux décès prématurés et 4,4 milliards de dollars sont associés aux frais directs en soins de santé (Agence de la santé publique du Canada, 2007; Rehm *et al.*, 2006).

La composition de la fumée de cigarette varie selon la nature du tabac et les additifs ajoutés par les différents manufacturiers (Talhout *et al.*, 2006). Toutefois, il est connu que la fumée de cigarette contient plus de 4000 substances chimiques toxiques, dont une soixantaine sont classées comme cancérogènes ou susceptibles de l'être (Hoffmann *et al.*, 1997; Pfeifer *et al.*, 2002). Parmi les substances, présentes dans la fumée de tabac, qui représentent un risque élevé pour la santé, il est possible de citer, l'acroléine, l'acétaldéhyde, l'acrylonitrile, le benzène, le 1,3-butadiène et le formaldéhyde (Nazaroff et Singer, 2004). L'acroléine est une

des substances toxiques les plus abondantes retrouvées dans la fumée de cigarette (3 à 220 µg/cigarette), elle possède un indice de danger très élevé et elle est de 10 à 1000 fois plus toxique que l'acétaldéhyde et le formaldéhyde (Esterbauer *et al.*, 1991 ; Dong *et al.*, 2000; Guerin *et al.*, 1987). De plus, plusieurs études épidémiologiques montrent que l'acroléine est impliquée dans les pathologies associées au tabagisme (Feng *et al.*, 2006; Mercado et Jaimes, 2007; van der Toorn *et al.*, 2007).

1.1.2 Historique et généralités

C'est Berzelius qui, en 1839, caractérise l'acroléine comme étant un produit de dégradation thermique de la glycérine. Il nomme cette substance chimique acroléine en raison de son odeur âcre (acid) et de sa consistance huileuse (oleum). Plus tard, en 1843, Redtenbacher montre que l'acroléine peut être préparée via le processus de distillation de la glycérine en présence des agents déshydratants. Il remarque également le potentiel lacrymogène de l'acroléine (Stevens et Maier, 2008). Depuis, plusieurs études toxicologiques, décrivant les effets néfastes de l'acroléine sur la santé humaine et sur l'environnement, ont été publiées. En 1999, l'acroléine est finalement classée comme un produit toxique au sens de l'article 64 de la loi canadienne sur la protection de l'environnement (Environnement Canada, 2000).

L'acroléine, également connue sous le nom d'acryaldéhyde, d'aldéhyde allylique, d'aldéhyde acrylique, de propénale ou de propène-2-al, est un aldéhyde α,β -insaturé hautement électrophile et réactif. À la température ambiante, l'acroléine se présente sous forme d'un liquide très volatil, inflammable incolore ou légèrement jaunâtre ayant une odeur désagréable, âcre et pénétrante. La

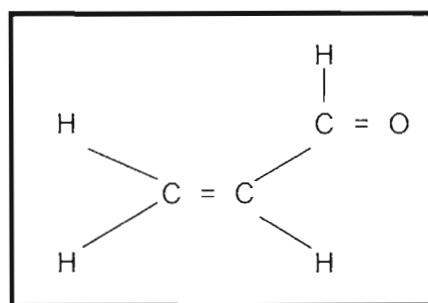


Figure 1.1 : Formule développée de l'acroléine (WHO, 2002).

formule brute de l'acroléine est C_3H_4O et son poids moléculaire est de 56,06g/mol. La formule développée de ce produit chimique est représentée à la figure 1.1 (WHO, 2002). La présence du groupement carbonyle rend la molécule polarisée et ainsi la double liaison entre les atomes de carbones devient déficiente en électrons. Ce caractère électrophile explique

l'importante réactivité de l'acroléine avec plusieurs sites nucléophiles cellulaires (Kehrer et Biswal, 2000).

L'acroléine est extrêmement toxique pour les organismes aquatiques et terrestres. Chez les humains, l'acroléine est toxique par inhalation, ingestion et par un contact dermique et peut causer une importante irritation des voies respiratoires, gastro-intestinales, de la peau et des yeux. Parmi les effets observés lors des expositions accidentelles à l'acroléine, il est possible de citer les nausées, les vomissements, la diarrhée, l'irritation respiratoire et oculaire, la bronchite, l'œdème pulmonaire et la mort (Beauchamp *et al.*, 1985). La concentration minimale de l'acroléine, qui est perceptible par les humains, est de $0,07 \text{ mg/m}^3$ (0,03 ppm). Les effets respiratoires comme la toux, une douleur thoracique et la difficulté à respirer peuvent se manifester suite à une inhalation d'une concentration de $0,6 \text{ mg/m}^3$ (0,3 ppm) d'acroléine et une exposition à 5 mg/m^3 (2 ppm) ou plus de cette substance toxique pendant plus de deux minutes n'est plus tolérable par la plupart des sujets. Des concentrations d'acroléines supérieures à 20 mg/m^3 (9 ppm) peuvent s'avérer létales (Environnement Canada, 2000).

Il n'y a pas de production commerciale d'acroléine au Canada. Cette substance chimique est importée des États-Unis où elle est synthétisée industriellement par l'oxydation du propène. En 2002, la production d'acroléine a été estimée à 100-500 million de livres (USDOHAH Services, 2006). Au Canada, l'acroléine est principalement utilisée dans la lutte antiparasitaire. Plus précisément, l'industrie pétrolière s'en sert comme herbicide aquatique dans les canaux d'irrigation et comme microbiocide dans l'eau durant les activités de prospection pétrolière. Les compagnies pétrolières emploient également l'acroléine pour capter le sulfure d'hydrogène et solubiliser les dépôts de sulfure ferreux qui causent l'obstruction des réservoirs et des barils (WHO, 2002).

Mise à part son utilisation dans l'industrie pétrolière, l'acroléine constitue également un produit de départ dans plusieurs synthèses chimiques. Ainsi, cette substance chimique est utilisée dans la production industrielle des polymères d'acrylate, de l'acide acrylique, de la DL-méthionine, du glutaraldéhyde et d'autres composés chimiques (Beauchamp *et al.*, 1985;

Ghilarducci et Tjeerdema, 1995). De plus, les polymères d'acroléine sont utilisés en photographie, dans le traitement du textile ainsi que dans l'industrie de pâte et papier. Dans la recherche, l'acroléine est employée pour fixer les tissus pour des études histologiques. Par ailleurs, le pouvoir lacrymogène et irritant de l'acroléine explique son utilisation comme poison militaire (Beauchamp *et al.*, 1985; Eisler, 2000).

1.1.3 Sources d'exposition humaine

L'acroléine est un polluant omniprésent dans l'environnement et l'être humain est inévitablement exposé à cette substance dans plusieurs situations. Les sources d'exposition les plus pertinentes peuvent être regroupées en sources environnementales, alimentaires et endogènes (Stevens et Maier, 2008). Quelques sources d'acroléine sont présentées dans le tableau 1.1.

L'acroléine peut être introduite dans l'environnement par des processus naturels de fermentation et de mûrissement. Elle est également générée lors des feux de forêt et par la combustion incomplète de la matière organique (Environnement Canada, 2000). Toutefois, les principales sources d'exposition humaine à l'acroléine proviennent des activités anthropiques. En milieu industriel, l'exposition à l'acroléine résulte de ses multiples utilisations (biocide, synthèse chimique, textile et autres) ainsi que de sa formation lors de la combustion de la matière organique telle que le bois, le charbon, le pétrole, le plastique et les huiles (Ghilarducci et Tjeerdema, 1995). Les pompiers sont à risque d'exposition à l'acroléine. En effet, les concentrations d'acroléine, mesurées durant les études des feux d'habitation, peuvent atteindre $7,3 \text{ mg/m}^3$ (3,2 ppm) (Ghilarducci et Tjeerdema, 1995; Materna *et al.*, 1992; Lees, 1995). D'autres industries dont celle de l'alimentation et de la restauration (Vainiotalo et Matveinen, 1993) ainsi que la sidérurgie (Henriks-Eckerman *et al.*, 1990) présentent également un risque d'exposition à l'acroléine pour les travailleurs.

Tableau 1.1 : Sources d'émission de l'acroléine (traduit et modifié de (ATSDR, 2007)).

Source	Concentration	Références
Gaz d'échappement des véhicules		
Moteurs à essence	0,01-10 ppm	(Lipari et Swarin, 1982; Nishikawa <i>et al.</i> , 1987)
Moteurs diesel	0,05-4,5 ppm	
		(Seizinger et Dimitriades, 1972)
Fumée de cigarette	3-220 µg/cigarette	(Dong <i>et al.</i> , 2000; Guerin <i>et al.</i> , 1987)
Aire de fumeurs dans les restaurants et bars.	0,1-10 ppm	
		(Nazaroff et Singer, 2004)
Fumée		
Bois	50 ppm	(Einhorn, 1975)
Cotton	60 ppm	(Einhorn, 1975)
Centrales électriques		
Alimentées au charbon	0,002 livre/ 1000 livre de combustible	(Natusch, 1978)
Alimentées au pétrole	0,1 livre/ 1000 livre de combustible	(Natusch, 1978)
Alimentées au gaz naturel	0,2 livre/ 1000 livre de combustible	(Natusch, 1978)
Foyers au bois	0,2-3 ppm	(Lipari et Swarin, 1982)
Pyrolyse du polyéthylène	2-23 ppm	(Potts <i>et al.</i> , 1978)
Pyrolyse des huiles de cuisson	0,049 ppm-0,392 ppm	(Shields <i>et al.</i> , 1995)

La principale source anthropique d'émission de l'acroléine dans l'environnement provient des processus de combustion et de la photo-oxydation des composés organiques volatils qui sont libérés des sources stationnaires (incinérateurs à déchets, chaudières, foyers, centrales électriques et autres) ainsi que des sources mobiles (automobiles, autobus, avions et autres) (Environnement Canada, 2000; Eisler, 2000; Ghilarducci et Tjeerdema, 1995). Par

exemple, la réaction du 1,3-butadiène, un hydrocarbure volatil retrouvé dans les gaz d'échappement des véhicules, avec le OH en présence de lumière conduit à la formation de l'acroléine (pour un mécanisme détaillé voir Tauzon *et al.*, 1999). L'acroléine peut également être produite suite à la photo-oxydation du propylène et d'autres dioléfinés (Faroon *et al.*, 2008).

Des concentrations de 0,05-4,5 ppm et de 0,01-10 ppm d'acroléine ont respectivement été détectées dans les gaz d'échappement des moteurs diesels et à essence (Lipari et Swarin, 1982; Nishikawa *et al.*, 1987; Seizinger et Dimitriades, 1972). L'acroléine est également dégagée dans le smog suite à la décomposition photochimique d'autres polluants atmosphériques tels que le 1,2-butadiène et le chlorure d'allyle. D'ailleurs, les effets irritants du smog sont attribués à l'acroléine (Environnement Canada, 2000; Eisler, 2000). Au Canada, la concentration moyenne d'acroléine dans l'air ambiant est de 1,3 µg/m³ (0,56 ppb) (Environnement Canada, 2000).

La concentration d'acroléine dans l'air intérieur est généralement de 2 à 20 fois supérieure à celle de l'air ambiant. Cette différence est principalement attribuable à la fumée de cigarette. D'ailleurs, cette dernière constitue la source principale d'exposition à l'acroléine pour la population générale. La quantité d'acroléine libérée dans la fumée de tabac varie entre 3 à 220 µg/cigarette dépendamment des additifs ajoutés dans les cigarettes (Dong *et al.*, 2000; Guerin *et al.*, 1987). Les concentrations d'acroléine détectées dans les aires de fumeurs dans les restaurants et les bars varient entre 0,1 et 10 ppm (Nazaroff et Singer, 2004).

En ce qui concerne les sources alimentaires, l'acroléine peut être libérée durant la cuisson des huiles végétales et des graisses animales à des températures élevées (Casella et Contursi, 2004; Ghilarducci et Tjeerdema, 1995; Beauchamp *et al.*, 1985). Ainsi, l'acroléine a été détectée, dans plusieurs vapeurs provenant des huiles à cuisson chauffée, à des concentrations variant de 49 µg/L (0,049 ppm) (huile d'arachide) à 392 µg/L (0,392 ppm) (huile de colza) (Shields *et al.*, 1995). D'ailleurs, certaines études épidémiologiques indiquent que l'émission d'acroléine de la cuisson wok augmente l'incidence des cancers de poumon chez les Chinoises (Gao *et al.*, 1987). L'acroléine est également présente dans plusieurs types

de viandes, le fromage, le caviar, les fèves de cacao, la liqueur de chocolat, la mélasse et les pommes de terre et l'oignon frits. L'origine de l'acroléine dans les aliments non cuits n'est pas documentée. Il est probable que ce composé toxique soit généré lors du processus de vieillissement via la peroxydation des lipides. De plus, le processus naturel de mûrissement des fruits produit de l'acroléine. Des concentrations de 0,01 à 0,05 ppm et de 0,59 ppm ont respectivement été mesurées dans les fruits et les légumes (Environnement Canada, 2000; Feron *et al.*, 1991). Durant la fermentation alcoolique ou l'entreposage et la maturation des boissons alcoolisées, il y a également génération de l'acroléine comme un sous-produit indésirable. La concentration maximale d'acroléine dans le vin rouge est estimée à 3,8 µg/g (Feron *et al.*, 1991; Environnement Canada, 2000).

Dans notre corps, l'acroléine est produite au cours de la peroxydation des lipides membranaires qui a lieu dans les conditions de stress oxydatif. En effet, l'acroléine est caractérisée, à la fois comme un produit et un initiateur de la peroxydation des lipides (Adams et Klaidman, 1993; Uchida, 1999). Aux sites d'inflammation, l'acroléine peut être formée à partir de la thréonine par l'enzyme myéloperoxydase des neutrophiles qui joue un rôle dans la défense de l'organisme contre les pathogènes (Anderson *et al.*, 1997). Le métabolisme des polyamines, dont la spermine et la spermidine, de l'alcool allylique et de l'allylamine constitue une autre source endogène d'acroléine (Boor *et al.*, 1987; Ghilarducci et Tjeerdema, 1995; Hoet et Nemery, 2000). Par ailleurs, les patients qui reçoivent des oxazaphosphorines, tels que le cyclophosphamide et l'isofosfamide, pour le traitement du cancer sont à risque d'exposition à l'acroléine, un métabolite de ces médicaments (Alarcon, 1976; Furlanut et Franceschi, 2003; Kaijser *et al.*, 1993). D'ailleurs, des adduits ADN-acroléine ont été détectés dans les lymphocytes sanguins périphériques chez des patients atteints d'un cancer qui ont reçu un traitement de cyclophosphamide (McDiarmid *et al.*, 1991). La figure 1.2 présente quelques réactions qui génèrent de l'acroléine dans notre corps.

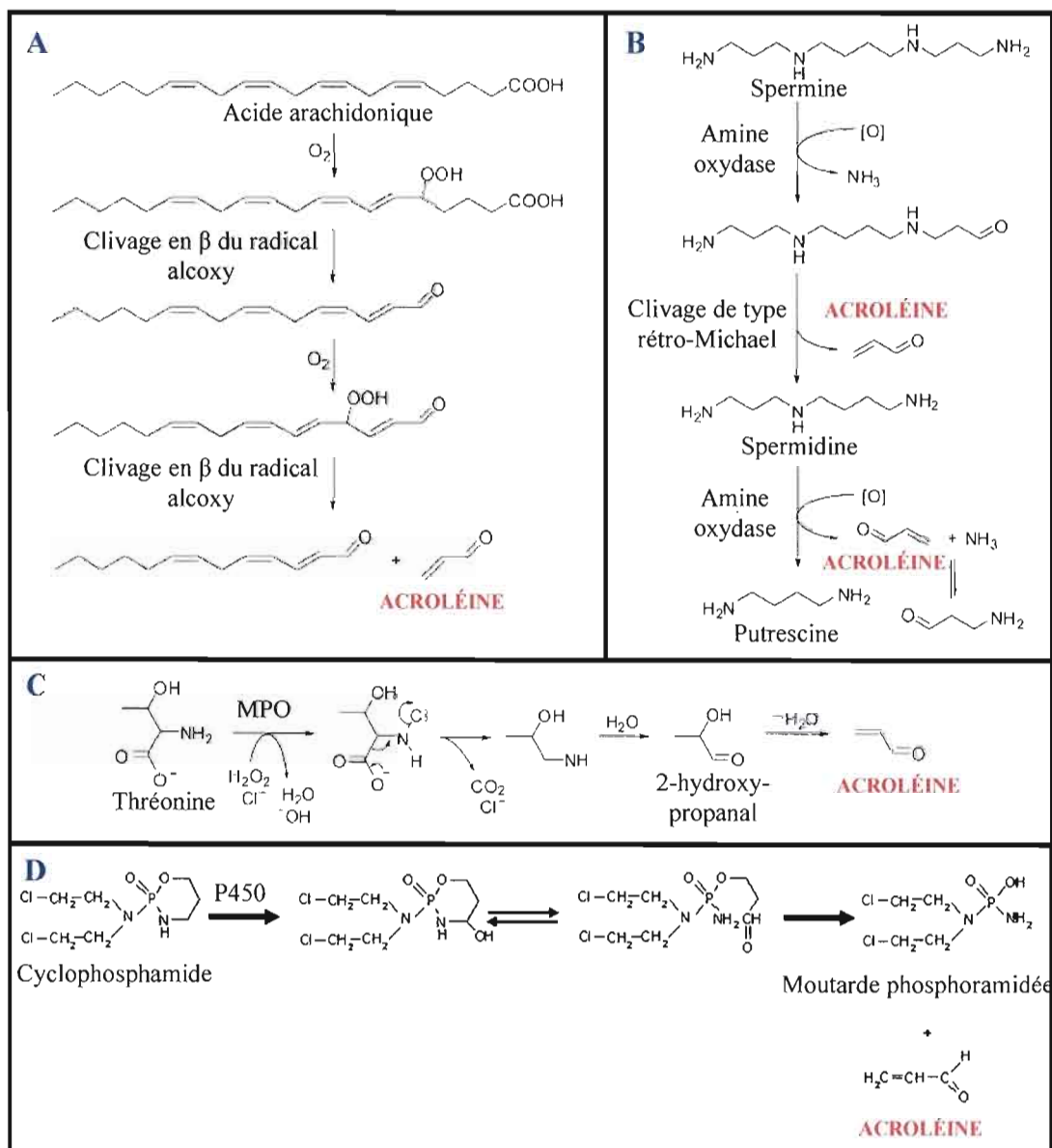


Figure 1.2 : Formation endogène de l'acroléine. **A)** Génération d'acroléine à partir de l'acide arachidonique durant la peroxydation des lipides (Esterbauer *et al.*, 1991; Stevens et Maier, 2008). **B)** Métabolisme des polyamines spermine et spermidine conduisant à la formation d'acroléine (Stevens et Maier, 2008). **C)** Production d'acroléine par la myéloperoxydase (MPO) du neutrophile, à partir de la thréonine, dans les sites d'inflammation (Anderson *et al.*, 1997; Stevens et Maier, 2008). **D)** Activation du cyclophosphamide, par le cytochrome P450 (P450), en moutarde phosphoramidée et en acroléine (Timm *et al.*, 2005).

1.1.4 Stabilité de l'acroléine dans l'environnement

L'acroléine est une substance très réactive et son accumulation dans l'environnement ainsi que son transfert d'un milieu à l'autre de l'environnement n'est pas significative (Environnement Canada, 2000; Ghilarducci et Tjeerdema, 1995). Cet aldéhyde toxique est éliminé à partir de l'environnement aqueux via les processus de volatilisation, d'hydratation réversible en β -hydroxypropanal et la biodégradation par les microorganismes. Dans le sol, l'acroléine peut être biodégradée, hydrolysée et volatilisée. En se basant sur la réactivité globale de l'acroléine, sa demi-vie est estimée entre 30 et 100 heures dans les eaux à surface et dans le sol (Mackay *et al.*, 1995; Environnement Canada, 2000; Ghilarducci et Tjeerdema, 1995). Dans l'atmosphère, l'acroléine réagit principalement avec le radical hydroxyle (OH). L'acroléine rejetée dans l'air peut également être éliminée via les processus de photolyse et suite à sa réaction avec les radicaux nitrates et l'ozone. La demi-vie de l'acroléine dans l'air est estimée à moins de dix heures (Mackay *et al.*, 1995; Environnement Canada, 2000).

1.1.5 Métabolisme de l'acroléine

Les études *in vivo*, chez les chiens, indiquent que 80-85% de l'acroléine inhalée est retenue dans le tractus respiratoire. Ceci suggère qu'il y a une faible absorption et donc une faible biodisponibilité de cette substance toxique (Egle, 1972; Parent *et al.*, 1996b; Parent *et al.*, 1998; WHO, 2002). La principale voie d'élimination de l'acroléine, *in vivo*, est sa conjugaison avec le glutathion (GSH) en présence de l'enzyme glutathion-S-transférase au niveau du foie (présentée dans la figure 1.3). Le conjugué ainsi produit est ensuite clivé pour libérer l'acide γ -glutamique et la glycine, et une N-acétylation du conjugué de cystéine restant donne lieu au S-(3-oxopropyl)-N-acétylcystéine (OPMA). Finalement, une réduction de ce composé conduit à la formation de l'acide 3-hydroxypropylmercapturique, qui est le principal métabolite de l'acroléine trouvé dans l'urine, et une oxydation de l'aldéhyde forme la S-carboxyéthyl-N-acétylcystéine (CEMA) (Patel *et al.*, 1980; Stevens et Maier, 2008). Une voie d'élimination moins importante implique une oxydation de l'acroléine avant sa conjugaison avec le GSH. L'oxydation de l'acroléine, par l'aldéhyde déshydrogénase, forme l'acide acrylique et la réaction impliquant l'époxydase aboutit au glycidaldéhyde qui est un composé instable et réagit rapidement soit avec l'eau pour former le glycéraldéhyde ou avec

le GSH pour former un conjugué stable (Parent *et al.*, 1998; Patel *et al.*, 1980; Stevens et Maier, 2008) (voir figure 1.3). Certaines études montrent également que l'acroléine peut réagir avec l'acide ascorbique (vitamine C), via la réaction de Michael, et ainsi former l'acroléine ascorbylée (détails dans la figure 1.3) (Eger *et al.*, 1987; Fodor *et al.*, 1983; Stevens et Maier, 2008).

1.1.6 Mécanismes de toxicité de l'acroléine : interactions avec les macromolécules biologiques

1.1.6.1 Formation des adduits au niveau de l'ADN

L'acroléine est soluble dans l'eau, l'alcool et dans le diéther. Par conséquent cette substance chimique peut facilement traverser les membranes plasmiques par diffusion passive. Une fois dans la cellule, l'acroléine peut réagir rapidement avec plusieurs sites nucléophiles tels que les acides nucléiques, les acides aminées, les peptides et les protéines (Stevens et Maier, 2008).

Plusieurs études montrent que l'acroléine est mutagène, chez les bactéries et les cellules des mammifères (Parent *et al.*, 1996a; Smith *et al.*, 1990; WHO, 2002), et présente des caractéristiques potentiellement cancérogènes (Feng *et al.*, 2006). De plus, cette substance toxique cause des aberrations chromosomiques et l'échange des chromatides sœurs (Au *et al.*, 1980; WHO, 2002). Ces effets génotoxiques peuvent être attribués à l'endommagement de l'ADN causé par l'acroléine. En effet, cet aldéhyde toxique peut réagir avec les sites nucléophiles de l'ADN, causer la rupture des brins ainsi que former des liens transversaux entre deux brins d'ADN ou entre les protéines et l'ADN. L'acroléine peut modifier les quatre bases azotées de l'ADN (guanine, adénine, thymine et cytosine) en formant des adduits cycliques par l'addition de Michael. Toutefois, la réaction majeure est celle de l'addition de N-1 ou N² de la désoxyguanosine (dG) au C-3 de l'acroléine. Cette addition suivie de la fermeture du cycle aboutit à la formation de deux régioisomères, α et γ -hydroxy-propanodésoxyguanosine (α et γ -OH-PdG) dont chacun est présent sous forme de deux stéréo-isomères R et S (Chung *et al.*, 1984; Pawlowicz *et al.*, 2006; Stevens et Maier, 2008) (voir figure 1.4).

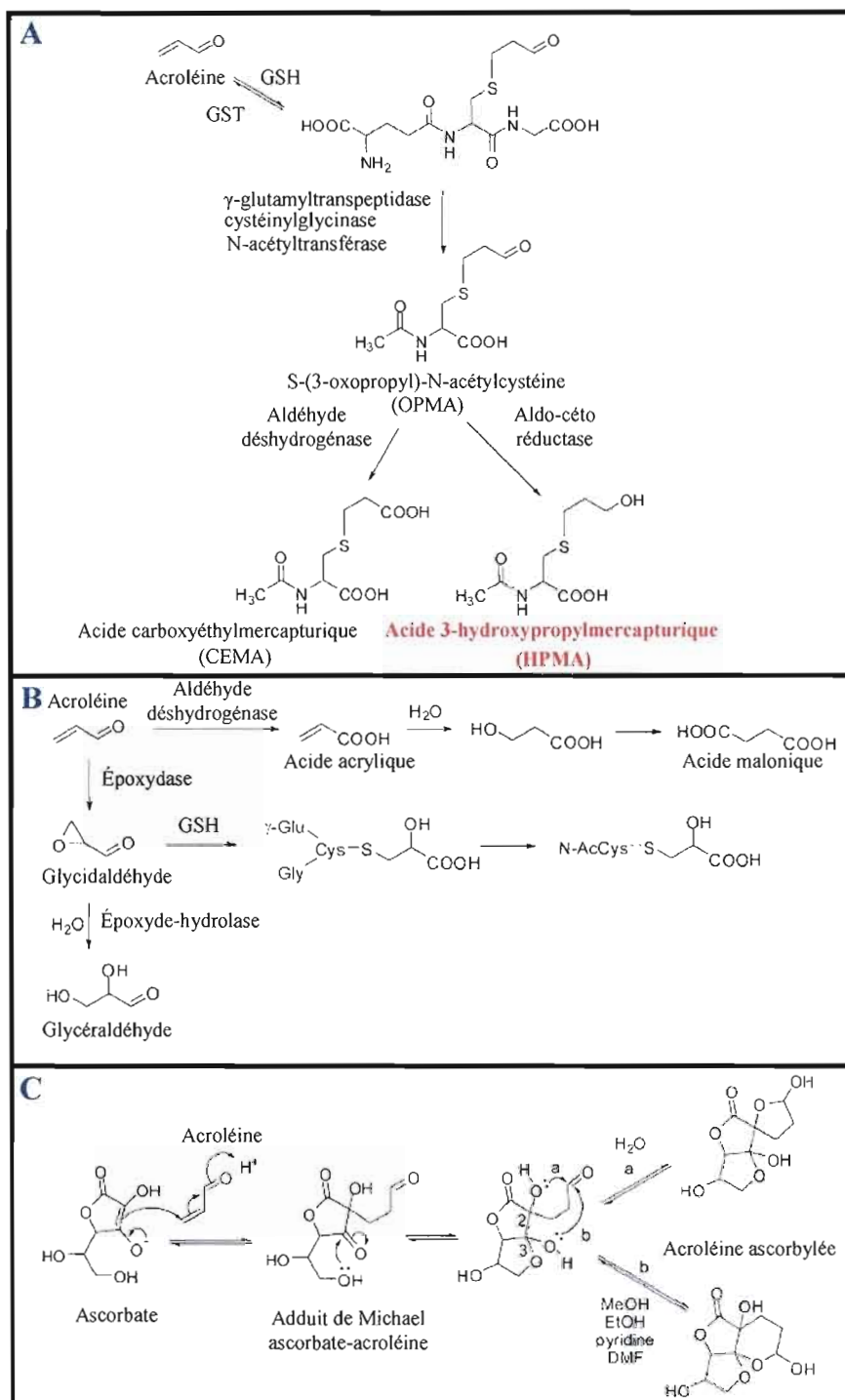


Figure 1.3 : Métabolisme de l'acroléine. A) Voie principale d'élimination de l'acroléine via sa conjugaison avec le GSH. B) Voie métabolique mineure de l'acroléine qui aboutit à la formation de l'acide acrylique ou de la glyceraldéhyde. C) Addition de Michael de l'ascorbate à l'acroléine. GSH : glutathion; GST : glutathion S-transférase (Stevens et Maier, 2008).

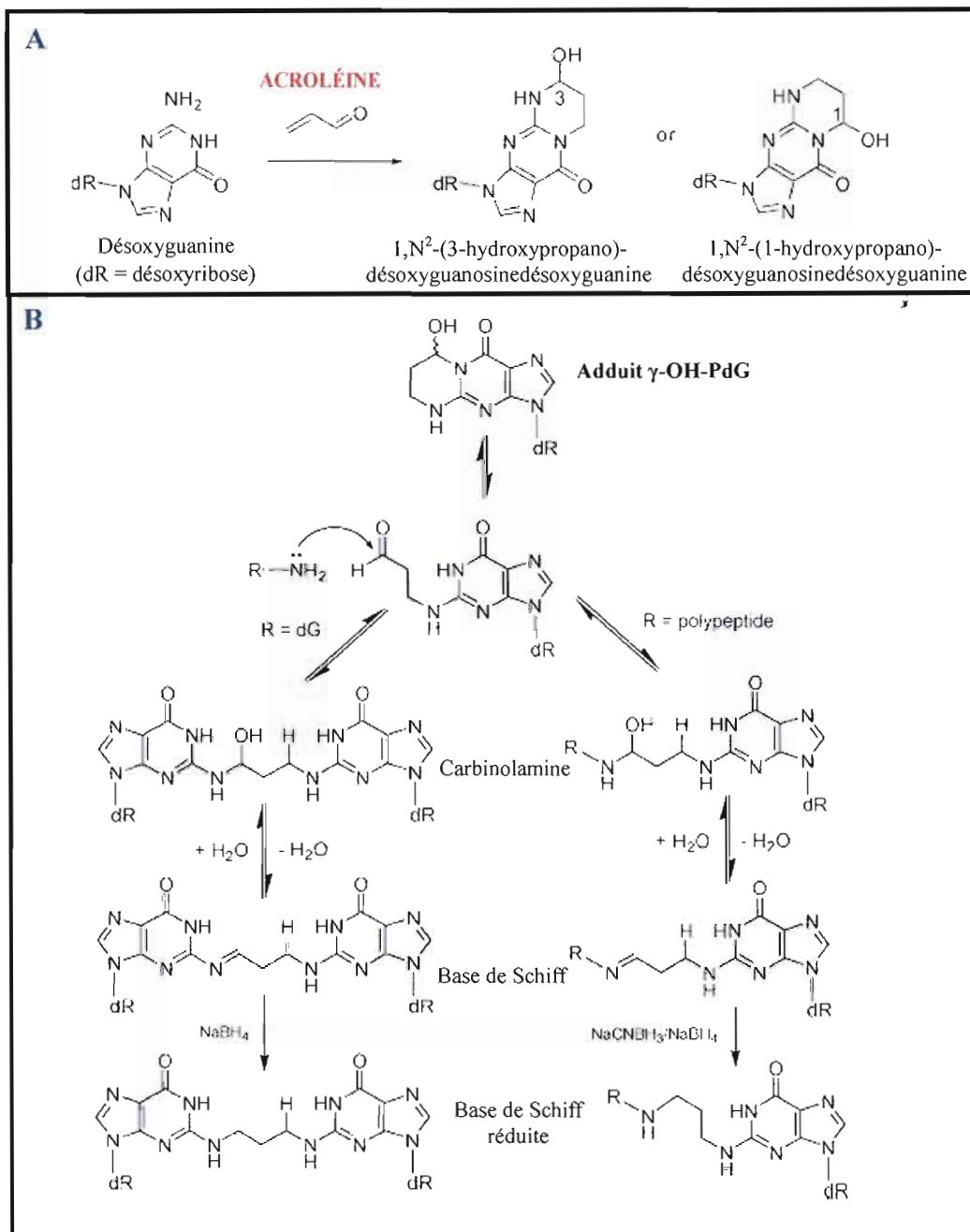


Figure 1.4 : Formation des adduits d'acroléine au niveau de l'ADN.

L'addition de Michael entre la désoxyguanine et l'acroléine forme deux régioisomères, α et γ -hydroxypropanodésoxyguanosine (α et γ -OH-PdG) (Stevens et Maier, 2008). B) Mécanisme de formation de liens transversaux entre deux molécules d'ADN (gauche) et entre l'ADN et les protéines (droite). Ce mécanisme a été étudié *in vitro*. $R-NH_2$ représente la base azotée dG de l'ADN (gauche) ou un polypeptide (droite). Le $NaCNBH_3/NaBH_4$ est un agent réducteur doux qui permet de réduire de façon sélective les imines. Il est employé ici pour confirmer la formation de la base de Schiff. Voir le texte pour la description du mécanisme proposé (Sanchez *et al.*, 2003).

C'est l'isomère γ qui est le produit majoritaire et il a été identifié dans les tissus humains et chez les rongeurs. De plus, l'adduit γ -OH-PdG est trois fois plus abondant dans les tissus buccaux des fumeurs comparativement à ceux des non fumeurs (Nath *et al.*, 1996; Nath *et al.*, 1998; Stevens et Maier, 2008). Ces données suggèrent que l'acroléine pourrait être impliquée dans la mutagenèse et la cancérogenèse induites par la fumée de cigarette (Feng *et al.*, 2006).

Les adduits cycliques de dG, formées par l'acroléine, interfèrent avec le processus normal d'appariement des bases Watson-Crick et peuvent ainsi inhiber la synthèse de l'ADN ou introduire des erreurs durant la réplication (VanderVeen *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2001). En effet, l'acroléine induit des mutations de transversion de G : C à T : A (Kawanishi *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2002). Ce type de mutation est souvent retrouvé dans le gène de p53 dans les cas de cancer de poumon attribué à la fumée de cigarette (Feng *et al.*, 2006).

Par ailleurs, l'adduit cyclique γ -OH-PdG peut subir un réarrangement spontané en une structure ayant un cycle ouvert (illustrée dans la figure 1.4). Cet équilibre, entre la forme ouverte et fermée de l'adduit γ -OH-PdG, est déplacé vers l'adduit ouvert dans la double hélice d'ADN (de los Santos *et al.*, 2001; Minko *et al.*, 2008; Stone *et al.*, 2008). Dans ce dernier cas, la fonction aldéhyde libre peut réagir avec des amines primaires de bases azotées, et ainsi former des liens ADN-ADN intra ou inter-chaîne (Kozekov *et al.*, 2003; Kozekov *et al.*, 2001; Sanchez *et al.*, 2003), ou des amines primaires de protéines et ainsi former des liens transversaux entre l'ADN et les protéines (Kurtz et Lloyd, 2003; Minko *et al.*, 2008; Sanchez *et al.*, 2003) (voir figure 1.4).

Mise à part l'action directe de l'acroléine sur l'ADN, cette substance toxique semble également inhiber le système de réparation de l'ADN par excision (Feng *et al.*, 2006; Grafstrom *et al.*, 1987). Par conséquent, les dommages à l'ADN ainsi que l'inhibition du système de réparation de l'ADN expliquent la génotoxicité de l'acroléine.

1.1.6.2 Formation des adduits au niveau des acides aminés des protéines

L'acroléine peut exercer son effet toxique à travers la modification covalente des acides aminés des protéines et des peptides. Plus précisément, cette substance chimique réagit avec les groupements thiols des cystéines, les groupements imidazoles des histidines, les groupements guanidines des arginines et les groupements ϵ -amines des lysines (réactions présentées dans la figure 1.5) (Esterbauer *et al.*, 1991; Lambert *et al.*, 2007; Stevens et Maier, 2008). Ces groupements nucléophiles des protéines peuvent réagir avec la double liaison électrophile de l'acroléine via la réaction de Michael ou via l'addition nucléophile (groupements amines) sur le groupement carbonyle de l'acroléine pour former une base de Schiff (Ishii *et al.*, 2007; Stadtman et Levine, 2000).

La réaction du résidu cystéine avec l'acroléine se déroule selon l'addition de Michael pour former un adduit propanal ayant la fonction aldéhyde libre (Lopachin *et al.*, 2007; Stevens et Maier, 2008). La même réaction s'applique pour le résidu histidine. Dans ce cas, l'acroléine peut s'additionner à l'un des deux azotes du groupement imidazole pour former ainsi le N ^{α} -acétyl-N ^{π} -formyléthylhistidine et le N ^{α} -acétyl-N ^{τ} -formyléthylhistidine (structures présentées à la figure 1.5) (Uchida *et al.*, 1998a). L'addition de Michael intervient également dans la modification de l'arginine par l'acroléine entraînant ainsi la formation d'un adduit cyclique (Lambert *et al.*, 2007; Stevens et Maier, 2008).

Le groupement ϵ -amine de la lysine, de son côté, peut réagir successivement avec deux molécules d'acroléine et former ainsi le N ^{ϵ} -(3-formyl-3,4-dehydropiperidino)-lysine (FDP-lysine) (Stevens et Maier, 2008; Uchida, 1999) (mécanisme illustré dans la figure 1.5). De plus, le système α,β -insaturé, présent dans la structure de la FDP-lysine, peut réagir avec les groupements thiols du GSH (Furuhata *et al.*, 2002) ou des protéines formant ainsi des conjugués de protéines qui peuvent aboutir à des agrégats protéiniques (Kuhla *et al.*, 2007). Par ailleurs, le groupement ϵ -amine de la lysine peut réagir avec le groupement carbonyle de l'acroléine et former ainsi une base de Schiff (voir figure 1.5).

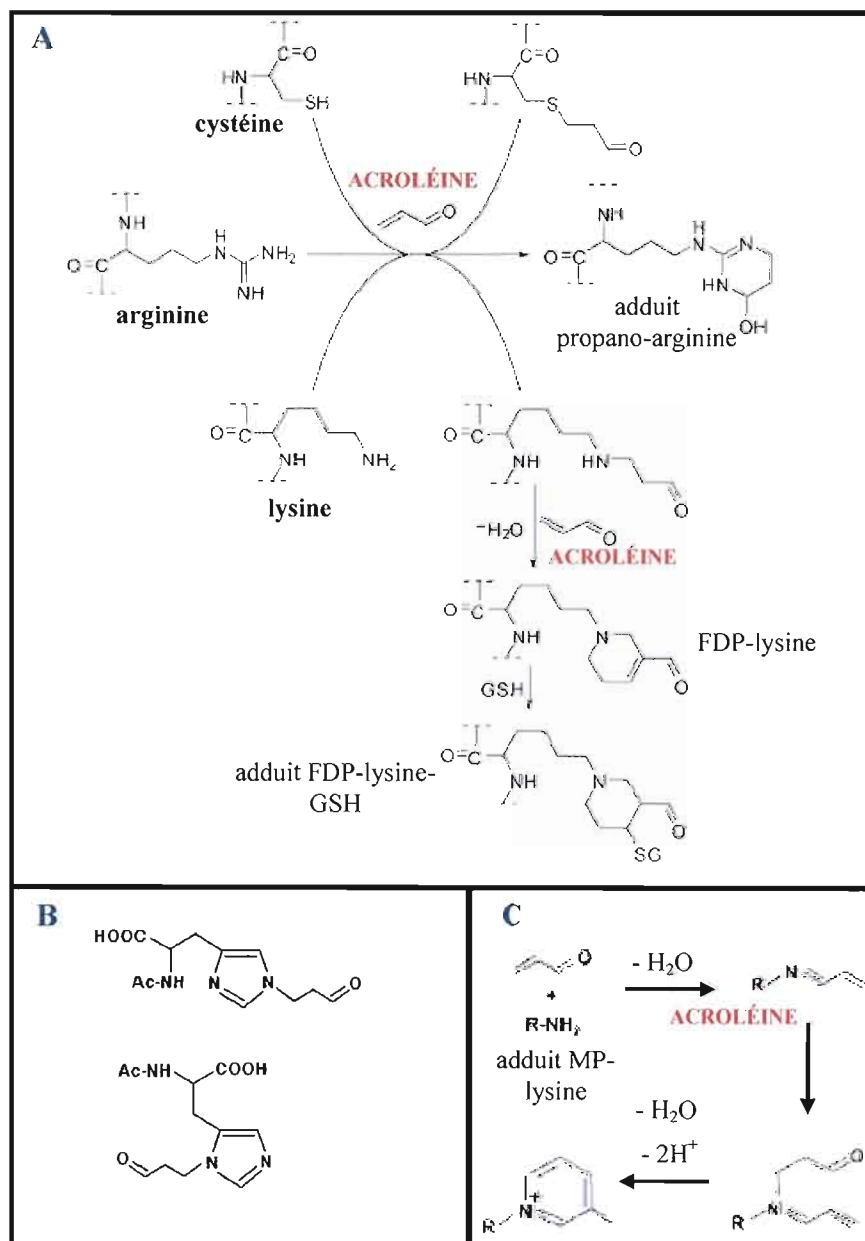


Figure 1.5 : Réactions de l'acroléine avec les acides aminés des protéines.

La réaction de l'addition de Michael de l'acroléine avec la cystéine, l'arginine et la lysine (Stevens et Maier, 2008). **B)** Structure du N^{α} -acétyl- N^{ϵ} -formyléthylhistidine (en haut) et du N^{α} -acétyl- N^{ϵ} -formyléthylhistidine (en bas) formés suite à la réaction de l'acroléine avec l'histidine (Uchida *et al.*, 1998a). **C)** Formation de l'adduit MP-lysine via l'addition nucléophile du groupement ϵ -amine de la lysine ($R-NH_2$) et du carbonyle de l'acroléine suivie d'une addition de Michael d'une deuxième molécule d'acroléine (Furuhata *et al.*, 2003).

Ce dernier produit est instable et peut réagir rapidement, via l'addition de Michael, avec une autre molécule d'acroléine pour former l'adduit N^ε-(3-méthylpyridinium)-lysine (MP-lysine) (structure présentée dans la figure 1.5). L'adduit MP-lysine est caractérisé comme produit mineur de la réaction de l'acroléine avec la lysine mais il est plus stable que l'adduit FDP-lysine (Furuhata *et al.*, 2003). Par ailleurs, la base de Schiff peut également être attaquée par d'autres groupements nucléophiles des acides aminés pour former des liens intra et inter moléculaires (Ishii *et al.*, 2007). Des conjugués de protéines ainsi formés sont associés à plusieurs pathologies (Stevens et Maier, 2008).

Cette réactivité de l'acroléine avec les acides nucléiques et les protéines interfère avec plusieurs processus cellulaires incluant l'activité de plusieurs facteurs de transcription et des enzymes ainsi que les voies régulées par le statut redox (Kehrer et Biswal, 2000; Stevens et Maier, 2008). La section suivante illustre quelques processus cellulaires affectés par une exposition à l'acroléine.

1.1.6.3 Interaction avec les groupements thiols et modulation de la signalisation d'oxydoréduction par l'acroléine

Chaque cellule est caractérisée par un état d'oxydoréduction (ratio entre les espèces oxydées et les espèces réduites) particulier qui régule plusieurs fonctions physiologiques telles que la division, la différenciation et la mort cellulaire (Schafer et Buettner, 2001). Dans la cellule, cette homéostasie d'oxydoréduction est principalement maintenue par le tripeptide GSH (γ -Glu-Cys-Gly) et la protéine thioredoxine (Trx). La figure 1.6 présente le cycle d'oxydoréduction du GSH et de la Trx. Les groupements thiols du GSH et de la thioredoxine réduite ($\text{Trx}(\text{SH})_2$) constituent des équivalents réducteurs qui s'oxydent durant la réaction d'oxydoréduction. Ensuite, les formes réduites de ces deux donneurs d'électrons peuvent être régénérées par l'action de la GSSG réductase et de la Trx réductase qui réduisent respectivement le glutathion oxydé (GSSG) et la thioredoxine oxydée (TrxS_2). Ainsi, le GSH et la Trx jouent un rôle d'antioxydant dans la protection de la cellule contre le stress oxydatif, en réduisant les espèces réactives de l'oxygène (ROS)/ espèces réactives d'azote (NRS), et participent dans la signalisation cellulaire associée à l'état d'oxydoréduction (Dalle-Donne *et*

al., 2008; Valko *et al.*, 2007). Les conditions physiologiques normales sont caractérisées par des rapports GSH/GSSG et Trx(SH)₂/Trx(SS) élevés.

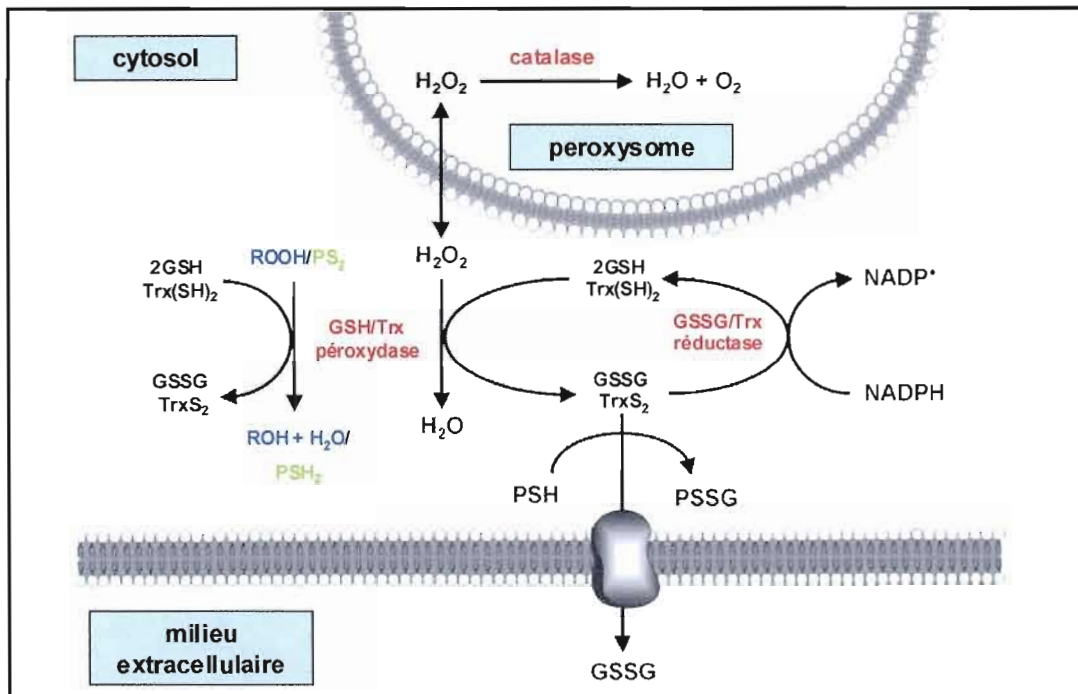


Figure 1.6 : Le cycle d'oxydoréduction du GSH et de la Trx. Le GSH et la Trx jouent un rôle dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène, des peroxydes lipidiques (ROOH), des protéines oxydées (PS₂) et des substances électrophiles en réduisant directement ces radicaux libres ou via leur association avec les GSH/Trx peroxydases. Le peroxyde d'hydrogène, généré durant le métabolisme aérobie, peut également être métabolisé par la catalase dans les peroxydosomes. La formation de GSSG par les GSH peroxydase peut donner lieu aux protéines disulfides mixtes (PSSG) via le processus réversible de S-glutathionylation. Pour maintenir l'équilibre d'oxydoréduction, le GSSG peut être expulsé de la cellule. Le GSSG et la Trx peuvent être réduits respectivement par les GSSG et Trx réductases qui utilisent le NADPH comme équivalent réducteur (modifié de Dalle-Donne *et al.*, 2008).

Toutefois, ce ratio peut chuter dans les conditions de stress oxydatif. Le stress oxydatif est caractérisé par une perturbation de l'équilibre entre la production des espèces oxydantes et leur élimination par les antioxydants en faveur des espèces oxydantes. Cette condition pathologique perturbe l'homéostasie d'oxydoréduction et peut causer des dommages moléculaires dans les cellules (Dalle-Donne *et al.*, 2008; Sies et Jones, 2007). Durant le stress oxydatif, le GSSG augmente et il se lie aux groupements thiols des protéines pour former des protéines disulfides mixtes, processus connu sous le nom de S-

glutathionylation. Cette réaction a pour but de protéger les protéines contre une oxydation irréversible des groupements thiols et d'induire la signalisation d'oxydoréduction en modifiant les cystéines des protéines telles que les récepteurs, les protéines kinases et les facteurs de transcriptions. La signalisation d'oxydoréduction est responsable de rétablir la balance d'oxydoréduction de la cellule et une fois cet équilibre atteint, les groupements thiols des protéines disulfides mixtes peuvent être réduits par le GSH ou par l'action des thiol-disulfide réductases (Dalle-Donne *et al.*, 2008; Klatt et Lamas, 2000; Schafer et Buettner, 2001).

La toxicité de l'acroléine peut être, en partie, attribuée à la réaction rapide de cet aldéhyde électrophile avec les groupements thiols du GSH et de la Trx causant ainsi leur déplétion (Go *et al.*, 2007; Horton *et al.*, 1997; Kehrer et Biswal, 2000; Stevens et Maier, 2008; Yang *et al.*, 2004). Par le même mécanisme, l'acroléine est également responsable de l'inactivation des enzymes GSH et Trx réductases (Nunoshiba et Yamamoto, 1999; Yang *et al.*, 2004). Ceci rompt la balance des groupements thiols, perturbe l'homéostasie d'oxydoréduction et cause le stress oxydatif. Cette situation de stress oxydatif peut être davantage amplifiée vu que ce dernier favorise la peroxydation des lipides qui est une source de génération de l'acroléine (Adams et Klaidman, 1993; Kehrer et Biswal, 2000; Stevens et Maier, 2008; Uchida *et al.*, 1998a). Ainsi, cette perturbation de l'équilibre d'oxydoréduction, par l'acroléine, affecte plusieurs voies de signalisation sensibles à l'état d'oxydoréduction au niveau de la transcription (facteur de transcription Nrf2, NF- κ B et AP-1) en induisant la transcription des gènes cibles ainsi qu'au niveau de la transduction du signal (les enzymes tyrosine phosphatases). Plus précisément, l'acroléine peut moduler ces voies directement, en réagissant avec les résidus cystéines des protéines de la voie de signalisation et en modifiant ainsi leurs activités, ou indirectement en modifiant l'état d'oxydoréduction de la cellule (Kehrer et Biswal, 2000).

L'acroléine, à des doses non létales, active le *nuclear erythroid-2 related factor 2* (Nrf2) (Kehrer et Biswal, 2000; Kwak *et al.*, 2003; Stevens et Maier, 2008; Tirumalai *et al.*, 2002) (voir figure 1.7). Le Nrf2 est un facteur de transcription qui contient un domaine de glissière à leucine et qui est impliqué dans la régulation de l'homéostasie d'oxydoréduction

ainsi que dans la défense contre les stress oxydatif et électrophile (Osburn et Kensler, 2008). Dans les conditions normales, ce facteur de transcription se trouve à l'état inactif, au niveau du cytosol, où il est associé avec la *Kelch-like ECH-associated protein 1* (Keap1).

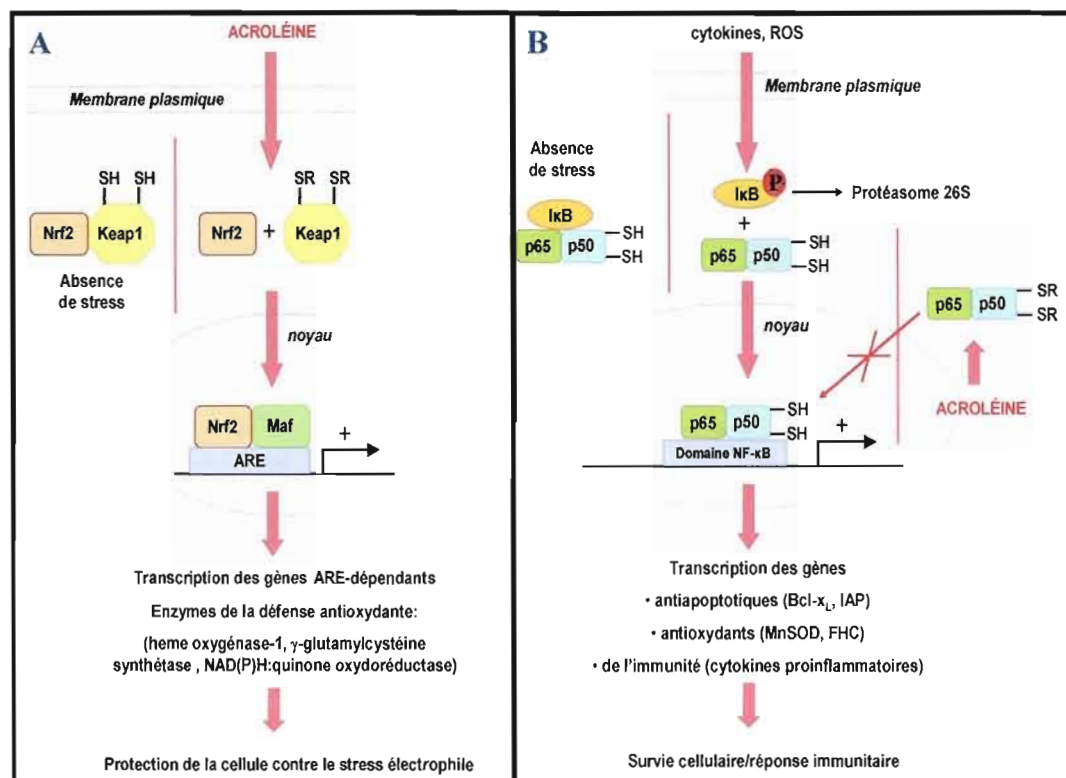


Figure 1.7 : Modulation de la signalisation d'oxydoréduction par l'acroléine.

L'acroléine induit l'activation du *nuclear erythroid-2 related factor 2* (Nrf2). La modification des groupements thiols de la protéine *Kelch-like ECH-associated protein 1* (Keap1), par l'acroléine, interfère avec son association avec la protéine Nrf2. Ceci diminue la protéolyse de Nrf2 et permet son accumulation au niveau du noyau. Une fois dans le noyau, le facteur de transcription Nrf2 active la transcription des gènes ARE-dépendants dont les enzymes de la défense antioxydante qui sont impliquées dans la protection de la cellule contre le stress électrophile induit par l'acroléine. Adapté de (Brigelius-Flohe, 2006). **B**) L'inhibition du facteur de transcription NF-κB par l'acroléine. Le NF-κB (p65/p50) est inactif lorsque lié à son inhibiteur IκB dans le cytosol. Les cytokines et les ROS peuvent induire l'activation du NF-κB qui se produit suite à la phosphorylation de IκB suivie de sa dégradation par le protéasome. Ceci libère le NF-κB qui s'accumule au niveau du noyau où il se lie à l'ADN et active la transcription de plusieurs gènes antiapoptotiques (lymphome de cellules B extra long (Bcl-XL) et protéine inhibitrice de l'apoptose (IAP)), antioxydants (*Manganese Superoxide Dismutase* (MnSOD) et *Ferritin Heavy Chain* (FHC)) et de l'immunité (cytokines pro-inflammatoires (Hayden *et al.*, 2006; Trachootham *et al.*, 2008)). Ainsi, le NF-κB joue un rôle dans la régulation de la survie cellulaire et de la réponse immunitaire. L'acroléine peut directement inhiber le NF-κB, en modifiant ses résidus cystéines, ou indirectement en changeant l'état d'oxydoréduction de la cellule. Ceci interfère avec la liaison du NF-κB avec l'ADN et cause ainsi l'inhibition de la prolifération ainsi qu'une suppression de l'immunité (Kehrer et Biswal, 2000). Adapté de (Brigelius-Flohe, 2006).

Keap1 régule la dégradation protéasomique de Nrf2 en favorisant sa liaison avec l'enzyme ubiquitine ligase E3 (Cullinan *et al.*, 2004; Dinkova-Kostova *et al.*, 2005). Le mécanisme d'activation de la protéine Nrf2, par l'acroléine, n'est pas encore élucidé. Il est possible que l'acroléine modifie, par alkylation, les résidus cystéine actifs de la protéine Keap1. Ainsi, ces modifications peuvent induire des changements de conformation dans cette protéine régulatrice qui perd son affinité envers Nrf2 et devient incapable de présenter ce facteur de transcription au système de dégradation par le protéasome. De plus, l'alkylation de la protéine Keap1 favorise son ubiquitination et ainsi sa protéolyse. Ceci stabilise la protéine Nrf2 et permet son accumulation au niveau du noyau (Eggler *et al.*, 2005; Stevens et Maier, 2008). Une fois dans le noyau, le facteur de transcription Nrf2 forme un complexe avec la protéine Maf. Ce complexe reconnaît l'*antioxidant response element* (ARE) au niveau de l'ADN et active la transcription des gènes codant pour les enzymes de la défense antioxydante. Plusieurs études montrent que l'acroléine induit l'expression des gènes ARE-dépendants dont ceux des enzymes antioxydantes hème oxygénase-1 (HO-1) (Thompson et Burcham, 2008b; Wu *et al.*, 2006) et la NAD(P)H : quinone réductase ainsi que l'enzyme impliquée dans la synthèse du GSH γ -glutamylcystéine synthétase (Tirumalai *et al.*, 2002).

L'enzyme HO-1 est impliquée dans l'étape limitante du catabolisme de l'hème qui produit de la biliverdine, du monoxyde de carbone (CO) et du fer (Fe^{2+}). La biliverdine est ensuite convertie en bilirubine par l'action de la biliverdine réductase (Farombi et Surh, 2006). La bilirubine ainsi formée possède des propriétés antioxydantes et jouent probablement un rôle dans la protection de la cellule contre les stress électrophile et oxydatif induits par l'acroléine. Plus précisément, la bilirubine, dans certaines conditions, joue le rôle de désactivateur des radicaux peroxydes (Stocker *et al.*, 1987) et protège les cellules contre les dommages causés par le peroxyde d'hydrogène (Baranano *et al.*, 2002). Par ailleurs, la NAD(P)H : quinone réductase est une enzyme qui est impliquée dans la régénération de la forme réduite et active de l'antioxydant α -tocophérol hydroquinone. Ce dernier inhibe le processus de peroxydation lipidique (Siegel *et al.*, 1997; Ross *et al.*, 2000). De son côté, l'induction de la γ -glutamylcystéine synthétase permet de générer le GSH qui participe dans les réactions de détoxification du peroxyde d'hydrogène, des peroxydes lipidiques ainsi que des protéines oxydées. (voir figure 1.6). Ainsi, l'induction de l'expression de ces gènes

protège la cellule contre les stress électrophile et oxydatif induits par l'acroléine (Stevens et Maier, 2008).

Un autre facteur de transcription, sensible à l'état d'oxydoréduction et qui est affecté par l'acroléine, est le facteur nucléaire- κ B (NF- κ B) (voir figure 1.7). Le NF- κ B est un important régulateur de la défense antioxydante, de l'apoptose, de l'inflammation ainsi que de la réponse immunitaire (Hayden et Ghosh, 2004; Trachootham *et al.*, 2008). Dans son état inactif, la protéine NF- κ B se trouve dans le cytosol où elle est liée à son inhibiteur *inhibitor of kappa light chain gene enhancer in B cells* (I κ B). L'activation du NF- κ B est médiée par la phosphorylation de I κ B qui, une fois phosphorylé, se dissocie du facteur de transcription. Lorsque le NF- κ B est libéré, il peut être transloqué dans le noyau où il se lie à l'ADN au niveau du promoteur et active la transcription des gènes cibles. L'acroléine est connue pour inhiber le facteur de transcription NF- κ B dans plusieurs modèles cellulaires (Horton *et al.*, 1999; Lambert *et al.*, 2007; Li *et al.*, 1999; Stevens et Maier, 2008; Valacchi *et al.*, 2005). Plusieurs mécanismes d'inhibition de NF- κ B ont été proposés. L'acroléine peut alkyler les cystéines de la I κ B kinase (IKK) qui est responsable de la phosphorylation de I κ B, étape qui aboutit à la protéolyse de cet inhibiteur suivie de la libération de NF- κ B (Ji *et al.*, 2001; Rossi *et al.*, 2000; Valacchi *et al.*, 2005). Lambert *et al.* (2007) suggèrent que l'acroléine inhibe la liaison de NF- κ B à l'ADN en formant des adduits de Michael avec les cystéines réactives de la sous unité p50 de ce facteur de transcription. L'acroléine peut également inhiber la voie du NF- κ B indirectement en perturbant l'homéostasie d'oxydoréduction. En effet, les cystéines de la sous unité p50 doivent être réduites pour que le NF- κ B puisse s'associer avec l'ADN et activer la transcription des gènes cibles (Mitomo *et al.*, 1994; Toledano et Leonard, 1991; Trachootham *et al.*, 2008). Le facteur de transcription NF- κ B active la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la survie cellulaire (protéines antiapoptotiques, enzymes antioxydantes) ainsi que dans la réponse immunitaire (cytokines proinflammatoires) (Karin et Lin, 2002; Trachootham *et al.*, 2008) (voir figure 1.7). Ainsi, l'inhibition de NF- κ B, par l'acroléine, est associée à l'inhibition de la prolifération cellulaire, l'induction de l'apoptose (Horton *et al.*, 1999; Kehrer et Biswal, 2000) ainsi qu'à la suppression de la défense de l'organisme contre les infections par les pathogènes (Jakab, 1977; Kasahara *et al.*, 2008; Li et Holian, 1998).

Le même mécanisme d'inactivation des facteurs de transcription, par l'acroléine, peut s'appliquer pour le complexe protéique protéine activatrice 1 (AP-1). Ce facteur de transcription, modulé par l'état d'oxydoréduction, est impliqué dans la régulation de la prolifération cellulaire et de l'apoptose. L'AP-1, sous forme d'un homo (Jun-Jun) ou hétérodimère (Fos-Jun), se lie aux séquences spécifiques de l'ADN et active la transcription des gènes (Kehrer et Biswal, 2000; Trachootham *et al.*, 2008). Biswal *et al.* (2002) ont montré que l'acroléine inhibe la prolifération des cellules A549 en inhibant le facteur de transcription AP-1. Cette inhibition est le résultat de l'alkylation des groupements thiols des cystéines de la protéine jun ainsi que de la modification de l'état d'oxydoréduction par l'acroléine (Biswal *et al.*, 2002; Kehrer et Biswal, 2000).

Mise à part la régulation au niveau de la transcription, l'acroléine interfère également avec la transduction de signal induit par les changements de l'état d'oxydoréduction. Récemment, Seiner *et al.* (2007) ont montré que l'acroléine modifie de façon covalente les cystéines retrouvées dans le site actif des protéines tyrosine phosphatases (Seiner *et al.*, 2007). Ces enzymes catalysent la réaction de déphosphorylation des résidus phosphotyrosines et, ensemble avec les protéines tyrosines kinases, régulent plusieurs voies de signalisation critiques impliquées dans la prolifération, la différenciation, le métabolisme ainsi que la migration cellulaires (Stevens et Maier, 2008; Tonks, 2003). L'inhibition des protéines tyrosines phosphatases, par l'acroléine, modifie plusieurs cascades de signalisation cellulaire et contribue ainsi à la toxicité de l'acroléine (Tonks, 2003).

Ainsi, l'acroléine affecte plusieurs voies de signalisation, sensibles à l'état d'oxydoréduction, en formant des adduits de Michael avec les groupements thiols des résidus cystéines critiques des protéines et/ou en perturbant l'homéostasie d'oxydoréduction de la cellule. Cette modulation des voies de signalisation, par l'acroléine, cause une activation de la transcription de plus de 700 gènes et une diminution de l'expression de plus de 200 gènes (Kehrer et Biswal, 2000) qui sont impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, de la transcription, de la signalisation cellulaire, de la synthèse des protéines ainsi que de l'apoptose (Thompson et Burcham, 2008a).

1.1.7 Pathologies associées à l'acroléine

L'acroléine est impliquée dans le développement de plusieurs maladies pulmonaires inflammatoires telles que l'asthme et les maladies pulmonaires obstructives chroniques (MPOC) incluant la bronchite chronique et l'emphysème (Leikauf *et al.*, 2002). En effet, l'acroléine peut induire plusieurs lésions associées à ces maladies et elle est retrouvée en concentrations élevées dans l'air expiré et dans les sécrétions muqueuses des patients atteints des MPOC (Corradi *et al.*, 2004). Ainsi, l'acroléine, en perturbant la balance d'oxydoréduction, favorise la génération des ROS au niveau des voies respiratoires. Les radicaux ainsi produits sont responsables de l'activation et du recrutement des cellules inflammatoires. Plus précisément, l'acroléine augmente la sécrétion du chimioattracteur de neutrophiles, l'interleukine-8 (IL-8), par les cellules épithéliales des bronches (Mio *et al.*, 1997), et favorise ainsi le recrutement de ces cellules inflammatoires au niveau des voies respiratoires. Également, l'acroléine inhibe l'apoptose des neutrophiles en inhibant l'activité de la caspase 3. Cette atténuation de l'élimination des cellules inflammatoires peut contribuer à l'amplification de la réaction inflammatoire et au développement de l'inflammation chronique au niveau des poumons (Finkelstein *et al.*, 2001; Finkelstein *et al.*, 2005). L'acroléine provoque également l'accumulation d'autres cellules inflammatoires au niveau des voies respiratoires telles que les macrophages et les lymphocytes (Borchers *et al.*, 2007). Par ailleurs, le stress oxydatif, généré par l'acroléine, est associé à la mort apoptotique des cellules épithéliales pulmonaires qui cause ainsi des lésions au niveau de l'épithélium des voies respiratoires (Borchers *et al.*, 2008; Borchers *et al.*, 2007; Nardini *et al.*, 2002). Ces dommages des tissus pulmonaires peuvent être amplifiés puisque l'acroléine interfère avec le processus de réparation des tissus en inhibant le recrutement, la prolifération ainsi que la contraction des fibroblastes (Carnevali *et al.*, 1998; Nakamura *et al.*, 1995).

La réparation du tissu pulmonaire est un processus complexe durant lequel les fibroblastes semblent jouer un rôle important. Suite à leur recrutement au niveau du tissu endommagé, ces cellules prolifèrent, produisent des protéines de la matrice extracellulaire et contribuent à la contraction du tissu et au remodelage de la matrice extracellulaire (Carnevali *et al.*, 1998; Clark, 1988). La contraction est un mouvement centripète qui participe à la

fermeture et à la cicatrisation des plaies. Le mécanisme exact de ce processus reste inconnu. Cependant, les hypothèses émises suggèrent l'implication du fibroblaste et du myofibroblaste qui possède à la fois les propriétés du fibroblaste et de la cellule musculaire lisse. Ainsi, ces cellules exercent des forces contractiles au voisinage de la plaie ce qui induit un mouvement vers l'intérieur des extrémités de la plaie. Ce mouvement implique des liaisons cellulaires et extracellulaires (Farahani et Kloth, 2008).

Également, l'acroléine cause une augmentation du nombre des cellules caliciformes (cellules qui sécrètent du mucus) ainsi qu'une augmentation de l'expression du gène MUC5AC qui code pour la glycoprotéine mucine 5AC, constituant protéique majeur du mucus, résultant ainsi en une hypersécrétion muqueuse (Borchers *et al.*, 1999; Costa *et al.*, 1986). En résumé, l'acroléine contribue au développement des maladies pulmonaires inflammatoires (asthme et MPOC) en causant l'inflammation chronique des voies respiratoires causée par une infiltration et activation des cellules inflammatoires (macrophages, neutrophiles, lymphocytes), la destruction de l'épithélium des voies respiratoires ainsi que la sécrétion accrue de mucus (Leikauf *et al.*, 2002).

La toxicité de l'acroléine se traduit également par sa capacité à supprimer la défense de l'hôte contre les infections bactériennes et virales dans les voies respiratoires (Jakab, 1977; Li et Holian, 1998). En effet, l'acroléine supprime l'activité antimicrobienne des macrophages alvéolaires en inhibant la sécrétion des cytokines inflammatoires (interleukine-1b, interleukine-12 et facteur de nécrose tumorale α) et en causant leur mort par apoptose et nécrose (Li *et al.*, 1997). L'inhibition de la sécrétion des cytokines inflammatoires, par l'acroléine, est également observée dans les neutrophiles, les lymphocytes ainsi que dans les cellules épithéliales des voies respiratoires (Lambert *et al.*, 2005; Valacchi *et al.*, 2005). Cette atténuation de la production des médiateurs inflammatoires, par l'acroléine, interfère avec la réponse immunitaire et contribue à l'immunosuppression pulmonaire. D'ailleurs, plusieurs études épidémiologiques montrent que les fumeurs sont plus susceptibles de développer des infections bactériennes telles que la pneumonie à pneumocoque, la maladie du légionnaire et l'infection à l'*Helicobacter pylori* ainsi que des infections virales comme le rhume et la grippe (revue par Arcavi et Benowitz, 2004). De plus, Galanakis et collaborateurs (2009)

suggèrent que l'exposition à la fumée secondaire augmente la fréquence d'infection ainsi que de cas d'hospitalisation pour cause d'infection chez les nourrissons (Ladomenou *et al.*, 2009).

À cause de la toxicité accrue de l'acroléine, il est difficile de caractériser le potentiel cancérogène de cette substance (IARC, 1985). Toutefois, Feng et collaborateurs (2006) ont montré que l'acroléine forme des adduits au niveau du gène de p53 dans les cellules pulmonaires. Ces adduits contribuent à des mutations de ce gène semblables à celles retrouvées dans les cas de cancers de poumons. Par conséquent, l'acroléine pourrait être impliqué dans le développement du cancer des poumons (Feng *et al.*, 2006).

Vu que l'acroléine constitue en même temps un produit et un initiateur de la peroxydation des lipides (Adams et Klaidman, 1993; Uchida, 1999), l'exposition à cette substance toxique peut contribuer au développement de plusieurs pathologies associées au stress oxydatif et à la peroxydation lipidique accrue (Kehrer et Biswal, 2000). Parmi ces pathologies, il est possible de citer les maladies neurodégénératives, l'athérosclérose ainsi que les maladies associées à l'insuffisance rénale chronique. La peroxydation des lipides membranaires est initiée par les radicaux d'oxygène produit lors d'un stress oxydatif. Ainsi, les ROS favorisent l'oxydation de la double liaison des acides gras insaturés des phospholipides membranaires ce qui déclenche une réaction en chaîne radicalaire qui aboutit au clivage des lipides oxydés et à la formation d'aldéhydes réactifs dont le 4-hydroxy-2-nonénal (HNE), le malondialdéhyde (MDA) ainsi que d'acroléine (voire figure 1.2 A). Parmi ces aldéhydes α,β -insaturés, l'acroléine est le composé le plus électrophile qui réagit rapidement avec les sites nucléophiles des protéines modifiant ainsi leurs structures et leurs fonctions biologiques (Stevens et Maier, 2008; Uchida, 2003).

Plusieurs études récentes montrent que la concentration d'acroléine est plus élevée dans les tissus de cerveaux atteints par la maladie d'Alzheimer par rapport à celle présente dans les tissus sains (Adibhatla et Hatcher, 2008; Butterfield *et al.*, 2002; Lovell *et al.*, 2000, 2001; Williams *et al.*, 2006). L'acroléine exerce son effet neurotoxique en inhibant plusieurs enzymes critiques pour la survie des neurones, telles que la Na^+/K^+ ATPase, et les transporteurs de glucose et de glutamate (Lovell *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2006). De plus,

la perturbation de l'équilibre d'oxydoréduction ainsi que l'alkylation des protéines, initiées par l'acroléine, interfèrent également avec la transmission de l'influx nerveux en inhibant l'entreposage, la libération ainsi que la recapture des neurotransmetteurs au niveau de la terminaison axonale (LoPachin et Barber, 2006; LoPachin *et al.*, 2008). Ceci perturbe les réseaux de circuits neuronaux et peut causer des difficultés dans la mémoire déclarative tel qu'observé chez les patients souffrant de la maladie d'Alzheimer (Palop *et al.*, 2006). L'acroléine perturbe également l'équilibre entre les phosphatases et les kinases et induit ainsi une hyperphosphorylation de la protéine tau dans les neurones. La protéine tau hyperphosphorylée perd sa conformation native et forme des structures composées de paires de filaments associées en hélice qui sont des constituants des enchevêtrements neurofibrillaires (Gomez-Ramos *et al.*, 2003; Kuhla *et al.*, 2007). L'acroléine semble également contribuer directement à la formation de la dégénérescence neurofibrillaire en formant des adduits avec la protéine tau qui ont été détectés dans les tissus cérébraux des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Calingasan *et al.*, 1999). De plus, la réaction de l'acroléine avec le peptide amyloïde β conduit à l'agrégation de ce peptide et contribue probablement à la formation des plaques séniles extracellulaires (Seidler *et al.*, 2006; Seidler et Squire, 2005). La dégénérescence neurofibrillaire ainsi que les plaques séniles sont des lésions histologiques qui contribuent à la dégénérescence du tissu cérébral et qui sont caractéristiques de la maladie d'Alzheimer (Adibhatla et Hatcher, 2008). Par ailleurs, l'acroléine réagit avec la protéine α -synucléine et favorise ainsi son agrégation et la formation des corps de Lewis dans le cytoplasme des neurones dopaminergiques du locus niger. Ces agrégats protéiques induisent la mort cellulaire des neurones qui caractérise la maladie de Parkinson (Shamoto-Nagai *et al.*, 2007). La lésion de la moelle épinière est une autre pathologie qui est caractérisée par une présence accrue d'acroléine dans le site des lésions primaires (zone agressée de façon mécanique). De plus, l'acroléine peut diffuser du site de génération vers les tissus sains environnant causant ainsi des effets toxiques au niveau des lésions secondaires (Hamann *et al.*, 2008; Luo *et al.*, 2005).

L'acroléine affecte également le système cardiovasculaire en favorisant le recrutement des macrophages au niveau de la paroi artérielle et en interférant avec le transport du cholestérol plasmatique. En effet, l'acroléine réagit avec la Trx et perturbe ainsi

l'équilibre d'oxydoréduction dans les cellules endothéliales. Ceci déclenche, via la génération des ROS, la signalisation inflammatoire ce qui favorise le recrutement des monocytes au niveau des cellules endothéliales, une étape précoce dans le développement de l'athérosclérose (Go *et al.*, 2007; Park et Taniguchi, 2008). Par ailleurs, des adduits d'acroléine avec les lysines de l'apoprotéine B-100, constituant majeur des lipoprotéines de faible densité (LDL), ont été détectés au niveau des plaques d'athéromes dans l'aorte humaine (Arikketh *et al.*, 2004; Uchida *et al.*, 1998b). L'acroléine est ainsi impliquée dans la modification oxydative des particules de LDL qui, lorsque modifiées, perdent leur structure et leur fonction, ne sont plus reconnues par les cellules cibles, s'accumulent dans les vaisseaux sanguins et sont phagocytées par les macrophages. L'accumulation des LDL modifiées dans les macrophages les transforme en cellules spumeuses ce qui est une étape clé dans la formation de la plaque d'athéromes qui est une lésion associée à l'athérosclérose (Arikketh *et al.*, 2004; Park et Taniguchi, 2008; Uchida *et al.*, 1998b). Le même mécanisme toxique est observé dans le cas des lipoprotéines de très faible densité (VLDL). Dans ce cas, l'acroléine modifie de façon covalente l'apoprotéine E qui joue un rôle dans l'incorporation de la VLDL vers les cellules hépatiques (Arai *et al.*, 2005; Tamamizu-Kato *et al.*, 2007). L'acroléine est également responsable de modifications des apoprotéines retrouvées dans les particules des lipoprotéines à haute densité (HDL). Plus précisément, l'acroléine forme des adduits avec l'apoprotéine A-I et interfère ainsi avec l'élimination du cholestérol des cellules de la paroi artérielle (Shao *et al.*, 2005a; Shao *et al.*, 2005b). Normalement, l'apoprotéine A-I est responsable de la mobilisation du cholestérol des macrophages de la paroi artérielle vers le foie qui élimine le cholestérol (Oram, 2003). Donc, l'inhibition de la fonction de l'apoprotéine A-I, par l'acroléine, favorise le développement des cellules spumeuses et de l'athérosclérose. Des études récentes montrent que l'acroléine inhibe l'activité de l'antithrombine, un inhibiteur important de la coagulation (Gugliucci, 2008). Cette inhibition résulte en une thrombose qui est impliquée dans l'étape finale de l'athérosclérose, conduisant à l'infarctus du myocarde et à l'accident cérébrovasculaire, et dans les maladies chroniques telles que l'insuffisance rénale chronique (Nieuwdorp *et al.*, 2005).

D'ailleurs, les concentrations plasmatiques d'acroléine libre et liée à des protéines sont plus élevées chez les patients souffrant de néphropathie diabétique, de néphropathie due

à l'hypertension artérielle ainsi que de glomérulonéphrite chronique, maladies associées à l'insuffisance rénale (Gugliucci *et al.*, 2007; Igarashi *et al.*, 2006). Le stress carbonyle, induit par l'acroléine, cause des modifications au niveau de la double membrane cellulaire et perturbe les voies de signalisation au niveau des cellules glomérulaires du mésangium causant ainsi des dommages au niveau du tissu rénal (Suzuki et Miyata, 1999; Suzuki *et al.*, 1999).

En résumé, la capacité de l'acroléine à développer ces maladies pulmonaires, neurodégénératives, cardiovasculaires et rénales est principalement liée à sa capacité à induire le stress oxydatif et à modifier la structure et la fonction des protéines.

1.1.8 Induction de la mort cellulaire par l'acroléine

L'acroléine peut induire la mort cellulaire par apoptose et par nécrose. Le type de mort cellulaire induit, par l'acroléine, peut varier en fonction du type cellulaire, des conditions de culture cellulaire ainsi que de la concentration de cette substance toxique (Stevens et Maier, 2008; Tanel et Averill-Bates, 2005; Thompson et Burcham, 2008b).

Ainsi, l'acroléine induit l'apoptose dans les cellules épithéliales bronchiques humaines (HBE1) (30 minutes de traitement dans le tampon Krebs-Ringer, 10-25 μM d'acroléine, apoptose mesurée 18-24 heures après le traitement) (Nardini *et al.*, 2002), les cellules d'adénocarcinome pulmonaire A549 (48 heures de traitement dans le milieu Eagle's modifié par Dulbecco (DMEM) sans sérum fœtal bovin (FBS), 100-200 μM d'acroléine (Hoshino *et al.*, 2001); 6 heures de traitement dans le tampon salin de Dulbecco (DBS) ou dans le milieu F12K/0,05% de FBS avec respectivement 5-50 μM d'acroléine et 100 μM d'acroléine (Thompson et Burcham, 2008b); 2 heures de traitement dans le milieu essentiel minimum α (α -MEM) avec 10% de FBS, 1-27 μM d'acroléine (Roy *et al.*, 2009), les macrophages alvéolaires humains (24 heures de traitement dans le milieu 199 avec 10% FBS, 25 μM d'acroléine) (Li *et al.*, 1997), les cellules humaines endothéliales de la veine ombilicale (HUVEC) (3 heures de traitement dans le milieu MCDB 131 sans FBS, 10-25 μM d'acroléine) (Misonou *et al.*, 2006), les kératinocytes humains (24 heures de traitement dans le milieu Humedia KG2 sans facteurs de croissance, 50 μM d'acroléine) (Takeuchi *et al.*,

2001) ainsi que dans les cellules ovariennes de hamster chinois (CHO) (4 et 24 heures de traitement dans le milieu α -MEM avec 10% de FBS, 30-50 μ M d'acroléine) (Tanel et Averill-Bates, 2005).

Toutefois, l'acroléine semble également avoir des effets d'inhibition sur le processus apoptotique et induit la mort par nécrose dans les neutrophiles humains (30 minutes de traitement dans le tampon Krebs-Ringer, 30 μ M d'acroléine, nécrose mesurée 16-24 heures après le traitement) (Finkelstein *et al.*, 2005) et les cellules lymphoïdes proB (30 minutes de traitement dans *Earle's balanced salt solution* (EBSS), 10-40 μ M d'acroléine, nécrose mesurée 24 heures après le traitement) (Kern et Kehrer, 2002). L'induction de la mort par nécrose a été également observée dans les cellules de la lignée cancéreuse dérivée du phéochromocytome de la médullosurrénale d'un rat (PC12) (4 heures de traitement dans le tampon phosphate salin (PBS), 100 μ M d'acroléine) (Liu-Snyder *et al.*, 2006) et les cellules humaines du tubule proximal (72 heures de traitement dans le milieu DMEM/Ham's F12 sans sérum, 15-300 μ M d'acroléine) (Schwerdt *et al.*, 2006) exposées à l'acroléine.

De plus, dans le cas des cellules d'adénocarcinome pulmonaire A549 (Thompson et Burcham, 2008b), des neutrophiles humains (Finkelstein *et al.*, 2005) et des cellules CHO, l'acroléine peut induire les deux types de mort cellulaire (apoptose et nécrose) dépendamment de la concentration. Dans le cas de chaque type cellulaire, les concentrations d'acroléine qui induisent l'apoptose sont inférieures à celles qui favorisent la nécrose.

La variabilité de ces résultats peut être expliquée par le fait que chaque type cellulaire (cellules tumorales, cellules du système immunitaire, cellules primaires) est caractérisé par un niveau différent de facteurs biochimiques qui régulent la mort cellulaire (Tanel et Averill-Bates, 2005). De plus, il est connu que les cellules tumorales ont un taux de GSH plus élevé que les cellules normales (Kehrer et Biswal, 2000). Ainsi, cette présence accrue de GSH peut protéger les cellules tumorales contre les effets toxiques de l'acroléine. Un autre facteur qui contribue à la variabilité des résultats présentés est la durée du traitement ainsi que la présence des substances nucléophiles dans le milieu de traitement. En effet, il est connu que l'acroléine réagit avec les protéines contenues dans le sérum. Ceci diminue la concentration

d'acroléine qui est susceptible de réagir avec les constituants cellulaires (Tanel et Averill-Bates, 2005; Thompson et Burcham, 2008b).

L'acroléine peut induire la mort apoptotique en activant la voie du récepteur de mort ainsi que la voie mitochondriale (Tanel et Averill-Bates, 2005, 2007a; Roy *et al.*, 2009). Toutefois, des concentrations plus élevées d'acroléine causent une destruction massive de la structure et de la fonction cellulaire (Kern et Kehrer, 2002). Dans ce cas, l'acroléine induit la nécrose en inhibant l'activité des caspases (Finkelstein *et al.*, 2001; Kern et Kehrer, 2002). Ces enzymes sont des protéases à cystéine qui sont impliquées dans la transduction du signal apoptotique ainsi que dans l'exécution de ce type de mort cellulaire. Vu que les caspases contiennent des groupements thiols, dans leur site actif, elles peuvent être inhibées par le stress oxydatif ou suite à une alkylation associés à l'acroléine. Ainsi, l'inhibition des caspases, par l'acroléine, peut favoriser la mort nécrotique (Finkelstein *et al.*, 2001; Kern et Kehrer, 2002; Stevens et Maier, 2008; Tanel et Averill-Bates, 2005). L'acroléine semble également favoriser la nécrose en perturbant la synthèse de l'ATP au niveau de la mitochondrie. Stevens et Maier (2008) ont identifié des adduits d'acroléine avec les protéines ATP synthétase et translocase de nucléotides adényliques (ANT) au niveau de la mitochondrie.

Ainsi, dépendamment du type cellulaire, de la concentration, et de la nature du traitement, l'acroléine induit la mort par apoptose ou par nécrose. L'induction de la mort cellulaire, par l'acroléine, dans plusieurs types cellulaires peut contribuer au développement de plusieurs conditions pathologiques.

1.2 Apoptose

1.2.1 Introduction

Au cours de l'évolution, plusieurs mécanismes de mort cellulaire se sont mis en place afin de mieux assurer la survie et le bien-être de l'organisme. La mort cellulaire programmée est un processus physiologique actif essentiel pour maintenir l'équilibre sain d'un tissu en éliminant les cellules endommagées ou en excès. Ainsi, ce type de mort cellulaire est impliqué dans le développement embryonnaire et dans le développement du système nerveux

central et immunitaire. Ce processus normal requiert un très haut niveau de régulation et nécessite la participation de plusieurs gènes et de protéines. D'ailleurs, une dérégulation de ce mécanisme physiologique conduit à plusieurs pathologies. L'absence de la mort cellulaire programmée peut contribuer au développement d'un cancer alors que son excès est impliqué dans les maladies neurodégénératives et auto-immunes ainsi que dans le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Il existe plusieurs types de mort cellulaire programmée, qui se distinguent par des caractéristiques morphologiques et biochimiques (Kroemer *et al.*, 2008), dont l'apoptose qui constitue la principale voie d'élimination des cellules de l'organisme.

Le terme apoptose a été introduit par Kerr en 1972 pour désigner un type de mort cellulaire qui est distinct de la nécrose (Kerr *et al.*, 1972; Kroemer *et al.*, 2008). Au cours de l'apoptose, tout d'abord, la cellule s'isole en perdant son contact avec les autres cellules du tissu. Ensuite, le cytoplasme se condense causant ainsi une importante diminution du volume cellulaire. La condensation se produit également au niveau du noyau où se produit en même temps le clivage de l'ADN en fragments réguliers. L'étape suivante est le bourgeonnement de la membrane cellulaire suivie de la fragmentation de la cellule en vésicules renfermant une partie du cytoplasme cellulaire, appelés corps apoptotiques. Finalement, ces vésicules apoptotiques sont dégradées par les cellules avoisinantes (phagocytes). L'intégrité de la membrane cellulaire, au cours de l'apoptose, permet d'éviter un déversement nocif du contenu cellulaire qui est susceptible d'endommager les cellules environnantes (Degterev *et al.* 2003 ; Elmore, 2007; Fink et Cookson, 2005). Plusieurs molécules sont responsables de ce phénomène et de la transduction du signal apoptotique qui peut être principalement induit par trois voies : la voie extrinsèque ou la voie de récepteur de mort, et deux voies intrinsèques qui impliquent chacune la mitochondrie et le RE.

1.2.2 Voies de signalisation de l'apoptose

1.2.2.1 Voie des récepteurs de mort

La voie du récepteur de mort peut être déclenchée suite à la liaison d'un ligand pro-apoptotique au niveau de son récepteur membranaire (Ashkenazi et Dixit, 1998). Les ligands pro-apoptotiques ou de mort sont des glycoprotéines membranaires de type II qui appartient à la famille de facteur de nécrose tumorale (TNF). Cette famille comprend plusieurs membres dont le TNF- α , le ligand Fas (TNFSF6, FasL, ligand CD95, Apo-1L) et l'*apoptosis ligand 2/tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand* (Apo2L/TRAIL). Dans les conditions physiologiques, ces ligands sont présents sous deux formes : liés à la membrane ou sous leur forme soluble suite à leur clivage protéolytique par des métalloprotéinases spécifiques (Chaigne-Delalande *et al.*, 2008; Kavurma *et al.*, 2008). Les récepteurs de mort des ligands de la famille de récepteurs du facteur de nécrose tumorale (TNFR), de leur côté, sont des protéines membranaires de type I. Parmi les récepteurs de mort contenus dans cette famille citons, le TNF-R1, le récepteur Fas (TNFRSF6, Apo-1, CD95), le récepteur de mort (DR) 4 (TNFRSF10A, TRAIL-R1, APO-2), DR5 (TNFRSF10B, TRAIL-R2), DR3 et DR6. Ces récepteurs de mort sont caractérisés par un domaine extracellulaire riche en cystéine, qui est impliqué dans la liaison du ligand, un domaine transmembranaire et un *death domain* (DD) cytoplasmique qui est responsable de la transduction du signal de mort (Chaigne-Delalande *et al.*, 2008; Wajant, 2003).

La liaison d'un ligand de la famille de TNF à un récepteur de la famille de TNF-R induit des changements conformationnels et cause ainsi l'activation du récepteur qui se traduit par une trimérisation de ce dernier suivie d'un recrutement de la protéine associée au domaine de mort Fas (FADD) ou de la protéine associée au TNFR1 avec un domaine de mort (TRADD) via les interactions entre les domaines DD (Thomas *et al.*, 2002; Valmiki et Ramos, 2008). La molécule FADD à son tour recrute, via les domaines effecteur de mort (DED), les procaspases 8 et 10 (Kischkel *et al.*, 2000; Kischkel *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2005). Le complexe protéique ainsi formé constitue le complexe inducteur de signal de mort (DISC) qui permet le regroupement de plusieurs procaspases 8 et 10. Ceci résulte en une dimérisation des procaspases 8 et 10 suivie d'une auto-protéolyse qui libère des caspases

actives au niveau du cytosol. Ces caspases initiatrices propagent ensuite le signal de mort en activant d'autres caspases effectrices 3, 6 et 7 qui assurent l'exécution de l'apoptose via la protéolyse de plusieurs molécules (Chaigne-Delalande *et al.*, 2008; Valmiki et Ramos, 2008) (voir figure 1.8).

Cette voie extrinsèque peut également amplifier le signal apoptotique en activant la voie intrinsèque de l'apoptose. Par exemple, dans les cellules caractérisées par la formation d'un faible nombre de complexes DISC, la caspase 8 active peut cliver et activer la protéine pro-apoptotique agoniste de mort interagissant par domaine BH3 (Bid) qui une fois tronquée est relocalisée au niveau de mitochondrie où elle participe dans les mécanismes responsables de la libération des molécules pro-apoptogènes (Barnhart *et al.*, 2003).

La famille TNF-R regroupe également quatre récepteurs de leurre (*Decoy receptor* (DcR) 1, DcR2, DcR3 et l'ostéoprotégérine) qui sont impliqués dans la régulation négative de la voie des récepteurs de mort. En effet, ces protéines sont caractérisées par l'absence du DD fonctionnel ce qui empêche la transduction du signal apoptotique suite à la liaison du ligand (Bhardwaj et Aggarwal, 2003).

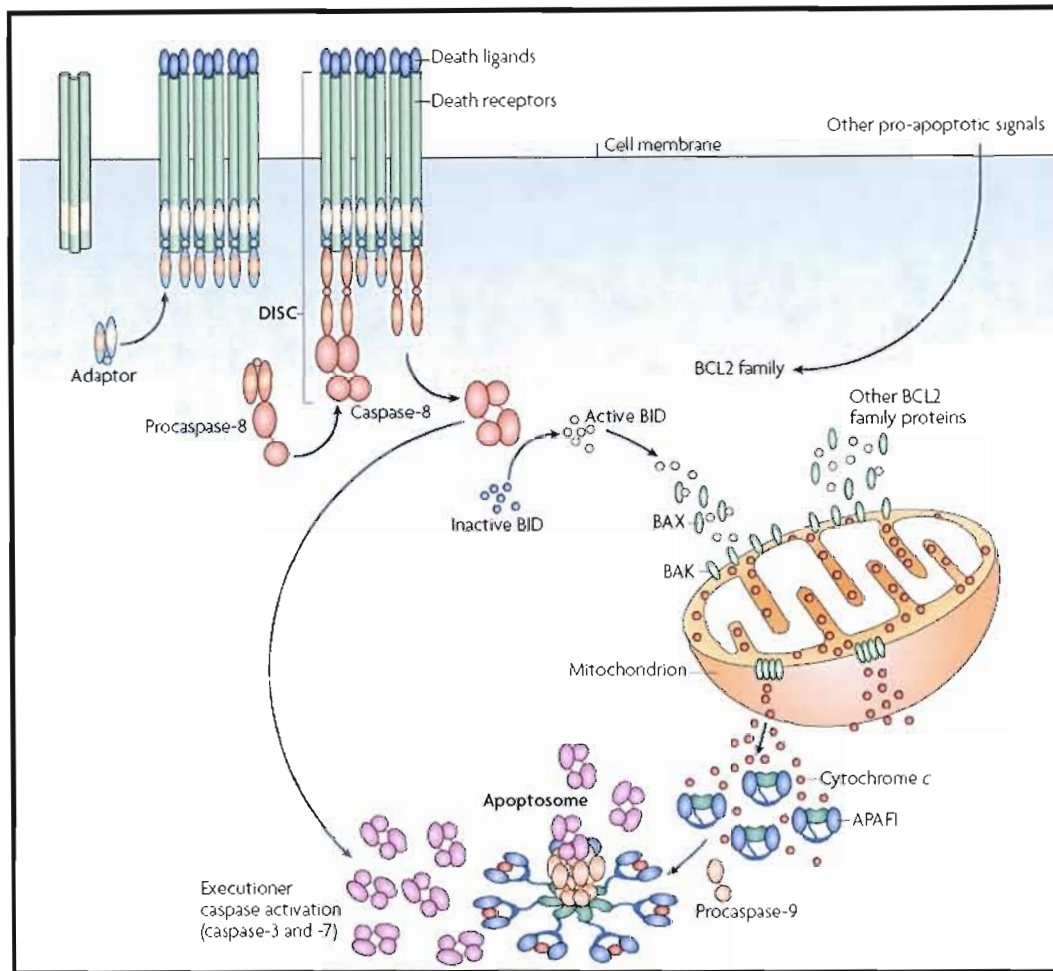


Figure 1.8 : Interaction entre la voie du récepteur de mort et la voie mitochondriale. La voie de récepteur de mort est initiée par la liaison du ligand (par exemple FasL) au récepteur transmembranaire (Fas) qui aboutit à la formation du complexe DISC, composé du récepteur de mort lié à un ligand, de la protéine adaptatrice FADD et de la procaspase 8 (ou 10). Le DISC constitue une plate-forme qui permet le rapprochement et l'activation des caspases. La voie intrinsèque de l'apoptose est activée par des stimuli qui cause la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (OMM) suivie de la libération des molécules pro-apoptotiques au niveau du cytoplasme. Plusieurs de ces molécules sont impliquées ou favorisent l'activation des caspases dont le cytochrome (cyt c). Dans le cytosol, le cyt c se lie au facteur activateur de protéase apoptotique-1 (Apaf-1) et en présence de desoxyadénosine triphosphate (dATP), il y a la formation de l'apoptosome. L'apoptosome est une plate-forme qui permet l'activation de la procaspase 9. Par ailleurs la caspase 8, activée par la voie extrinsèque, peut cliver et activer Bid. Cette protéine joue un rôle dans la voie mitochondriale et constitue ainsi un point d'interaction entre les deux voies. Les caspases initiateurs activent ensuite les caspases effectrices de l'apoptose (traduit de Ow *et al.*, 2008).

1.2.2.2 Voie mitochondriale

La mitochondrie est une organelle dynamique impliquée dans plusieurs processus physiologiques dont la production de l'énergie, l'oxydation des lipides, la génération des ROS, l'entreposage du calcium et elle joue un rôle central dans la régulation de l'apoptose (McBride *et al.*, 2006; Pedersen, 1999). Plusieurs stress sont associés à l'induction de la voie mitochondriale de l'apoptose dont les stress chimiques et physiques (radiations UV, choc osmotique, hypoxie, choc thermique), la modulation de l'expression des proto-oncogènes (p53, c-Myc), la désintégration de la structure du cytosquelette, les dommages à l'ADN ainsi que la privation des facteurs de croissance (Klener *et al.*, 2006). Tous ces facteurs déclenchent une signalisation qui converge vers une étape déterminante de l'induction de l'apoptose, la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (OMM). Cette perte d'intégrité de la perméabilité de l'OMM permet la libération des protéines pro-apoptotiques de l'espace inter-membranaire dans le cytosol ce qui déclenche l'activation des caspases et la mort apoptotique (Belizario *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2008) (voir figure 1.8).

Les mécanismes responsables de la perméabilisation de l'OMM ne sont pas entièrement compris. Plusieurs études montrent que les protéines de la famille lymphome de cellules B de type 2 (Bcl-2) sont impliquées dans la régulation de ce phénomène soit directement en formant des pores au niveau de l'OMM ou indirectement en déclenchant la transition de perméabilité (Gogvadze et Zhivotovsky, 2007; Green et Kroemer, 2004; Smith *et al.*, 2008). La famille de Bcl-2 est constituée de trois groupes de protéines qui se distinguent par la présence des domaines d'homologie à Bcl-2 (BH) : les protéines anti-apoptotiques et les protéines pro-apoptotiques. Les protéines pro-apoptotiques regroupent les protéines aux domaines multiples (Bak, Bax, Bok) et les protéines à un seul domaine BH3 (Bid, Bim, Bad, Bik et d'autres) (voir figure 1.9) (Chipuk et Green, 2008; Youle et Strasser, 2008). Les protéines anti-apoptotiques, dont Bcl-2, *Bcl-2-like 2* (Bcl-w) et lymphome de cellules B extra long (Bcl-XL), contiennent quatre domaines BH (BH1-BH4). Elles inhibent la perméabilisation de l'OMM en s'associant avec les protéines pro-apoptotiques antagoniste/tueur homologue à Bcl-2 (Bak) et protéine X associée à Bcl-2 (Bax). Au cours du processus apoptotique, ces protéines pro-apoptogènes Bax et Bak sont activées ce qui se

traduit par leur oligomérisation au niveau de l'OMM. Ceci conduit à la formation des pores protéolipidiques au niveau de l'OMM qui sont responsables de la perméabilisation de l'OMM. L'activation des protéines pro-apoptogènes (Bak et Bax) aux domaines multiples est assurée par les protéines à un seul domaine BH3 (Bid, Bim, Bad). Ces protéines peuvent agir directement, en s'associant et activant les protéines pro-apoptogènes Bax et Bak (Bid et Bim), ou indirectement en inhibant les protéines anti-apoptotiques (Bad) (Bras *et al.*, 2005; Chipuk et Green, 2008; Youle et Strasser, 2008).

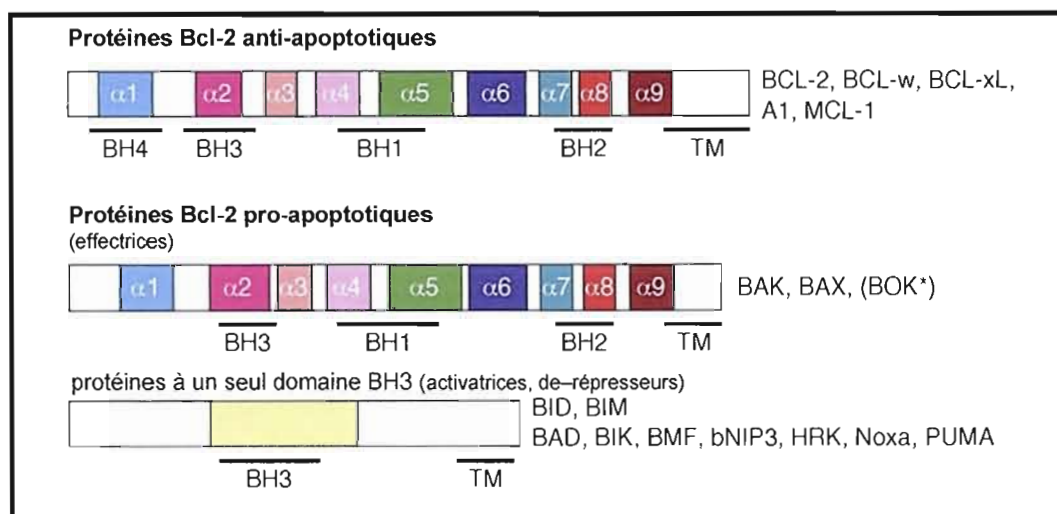


Figure 1.9 : Les protéines de la famille de Bcl-2 sont divisées en trois groupes fonctionnels qui diffèrent par leur composition en domaines d'homologie de Bcl-2 (BH). Les membres anti-apoptotiques, qui regroupent les protéines Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, A1 et Mcl-1, contiennent quatre domaines BH (BH1-BH4). Les protéines pro-apoptotiques aux domaines multiples (Bak, Bax et Bok) contiennent trois domaines BH (BH1-BH3). Les protéines à un seul domaine BH3 regroupement les protéines activatrices (Bid et Bim), qui activent directement les protéines pro-apoptotiques aux domaines multiples, et les protéines de-répresseurs (Bad, Bik, Bmf, bNIP3, Hrk, Noxa, Puma) qui activent indirectement les protéines pro-apoptotiques aux domaines multiples en inhibant les protéines anti-apoptotiques. Les structures en hélice α ainsi que les régions contenues au niveau des domaines BH sont illustrés. Les domaines hydrophobiques transmembranaires présents au niveau de l'extrémité C-terminale, sont mis en évidence par l'analyse de la structure et sur les prédictions in silico et ne sont pas présents chez tous les membres. Traduit de (Chipuk et Green, 2008).

Par ailleurs, les protéines pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2 peuvent provoquer la perte de l'intégrité de l'OMM en favorisant l'ouverture du pore de perméabilité transitoire

mitochondrial (PTP) (Bras *et al.*, 2005; Jin et El-Deiry, 2005). Le PTP est un complexe multimérique, composé d'un canal anionique voltage dépendant (VDAC : membrane externe), d'un récepteur périphérique des benzodiazépines (PBR), d'une cyclophiline D et de ANT (membrane interne). L'ouverture de ce complexe cause la dissipation du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) et le gonflement osmotique de l'espace inter-membranaire aboutissant à la rupture de l'OMM (Green et Kroemer, 2004; Klenner *et al.*, 2006). Les études montrent que Bax et Bid peuvent induire l'ouverture du PTP en interagissant directement avec VDAC (Shimizu *et al.*, 1999) et ANT (Bras *et al.*, 2005; Marzo *et al.*, 1998). Les protéines pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2 peuvent également induire la mobilisation du calcium à partir du RE et déclencher ainsi l'ouverture du PTP de façon indirecte. En effet, le calcium libéré du RE s'accumule au niveau de la mitochondrie où il stimule la génération de ROS qui sont impliqués dans l'ouverture du PTP (Hetz, 2007; Klenner *et al.*, 2006). Plus précisément, le calcium peut favoriser la production de ROS en stimulant l'activité de l'enzyme oxyde nitrique synthétase. Ainsi, une accumulation de l'oxyde nitrique au niveau de la mitochondrie inhibe la chaîne de transport des électrons (complexe IV) ce qui indirectement favorise la génération des ROS (Alderton *et al.*, 2001; Feissner *et al.*, 2009). D'un autre côté, la transition de perméabilité peut être inhibée par les membres anti-apoptogènes de la famille de Bcl-2 (Shimizu *et al.*, 1998; Tsujimoto et Shimizu, 2007). Par conséquent, le ratio entre les protéines anti et pro-apoptogènes de la famille de Bcl-2 constitue un mécanisme qui contrôle la perméabilisation de l'OMM et l'apoptose.

L'espace inter-membranaire mitochondriale contient plusieurs protéines apoptogènes qui sont libérées dans le cytosol suite à la perméabilisation de l'OMM et qui peuvent induire la voie apoptotique dépendante ou non des caspases (Jeong et Seol, 2008). L'induction de signalisation apoptotique dépendante des caspases est déclenchée par la libération, dans le cytosol, du cytochrome c (cyt c) qui participe normalement dans la chaîne de transport des électrons. Dans le cytosol, le cyt c s'associe avec le facteur activateur de protéase apoptotique-1 (Apaf I) ce qui permet l'hydrolyse du désoxyadénosine triphosphate (dATP) et induit ainsi des changements conformationnels qui déclenchent son oligomérisation en un heptamère ainsi que l'exposition de son *caspase-recruitment domains* (CARD) (Kim *et al.*, 2005; Riedl et Salvesen, 2007; Zou *et al.*, 1999). Finalement, le recrutement de la procaspase

9, via les interactions entre les domaines CARD, complète la formation de l'apoptosome. Ce complexe protéique de haut poids moléculaire permet l'homodimérisation de la procaspase 9, une étape déterminante dans son activation, suivie de son auto-clivage (Bao et Shi, 2007; Boatright *et al.*, 2003; Bras *et al.*, 2005; Renatus *et al.*, 2001; Riedl et Salvesen, 2007). La caspase 9 active continue la transduction du signal apoptotique en activant, par clivage protéolytique, les caspases effectrices 3 et 7 de l'apoptose. La cascade protéolytique est alors initiée et amplifie le signal apoptotique ce qui mène vers la mort apoptotique de la cellule (Bras *et al.*, 2005; Chowdhury *et al.*, 2008; Fan *et al.*, 2005).

Toutefois, l'activation des caspases 9 et 3 médiée par l'apoptosome peut être inhibée par les protéines inhibitrices de l'apoptose liée au chromosome X (XIAP) (Bratton *et al.*, 2001). Cette action est contrée par la protéine liante de l'IAP avec un dérivé de la mitochondrie activateur de caspase (Smac/DIABLO) et la protéine A2 haute température requise / endoprotéase régulée par le stress (Omi/HtrA2) qui sont également libérées de l'espace inter-membranaire suite à la perméabilisation de l'OMM. La protéine Smac/DIABLO s'associe aux protéines XIAP résultant ainsi en leur séquestration (Du *et al.*, 2000). La protéase Omi/HtrA2, quant à elle, prévient l'action des XIAP en induisant leur clivage protéolytique (Hegde *et al.*, 2002).

Parmi les protéines mitochondriales qui sont impliquées dans la voie apoptotique indépendante des caspases, il est possible de citer le facteur inducteur d'apoptose (AIF) et l'endonucléase G (EndoG). Suite à la perméabilisation de l'OMM, ces deux facteurs apoptogènes sont transloqués au niveau du noyau où ils induisent la dégradation de l'ADN (Bras *et al.*, 2005; van Gurp *et al.*, 2003). Plus précisément, la flavoprotéine AIF n'a pas d'activité nucléasique. Une fois libéré au niveau du cytosol, l'AIF s'associe avec l'endonucléase cyclophiline A. Le complexe est ensuite transloqué au niveau du noyau où il s'associe avec l'ADN initiant ainsi sa dégradation (Zhu *et al.*, 2007; Cande *et al.*, 2004; Krantic *et al.*, 2007).

1.2.2.3 Voie du réticulum endoplasmique

1.2.2.3.1 Stress du réticulum endoplasmique

Le RE est une organelle intracellulaire des eucaryotes composée par un réseau membraneux continu, formé de citernes et de microtubules, qui s'étend de l'enveloppe nucléaire à la surface cellulaire (Voeltz *et al.*, 2002). Ce compartiment cellulaire, à grande surface, est dynamique et est divisé en plusieurs domaines (RE granuleux, RE lisse et l'enveloppe nucléaire) qui sont caractérisés par une structure et fonction particulière (Vertel *et al.*, 1992; Bamann et Waltz, 2001). De plus, ces domaines peuvent être transformés en une structure alternative afin de répondre à des signaux cellulaires (Borgese *et al.*, 2006). Cette diversité dans la structure du réticulum endoplasmique permet à ce dernier d'assurer plusieurs fonctions vitales dont la synthèse des phospholipides et des stéroïdes ainsi que l'entreposage du calcium (Meldolesi et Pozzan, 1998). Cependant, le RE est reconnu principalement pour être un site de synthèse et de maturation des protéines de la membrane cytoplasmique, des organelles intracellulaires et des protéines sécrétées.

Lors de la traduction, un tiers des protéines sont transloquées au niveau du RE où elles subissent des modifications post-traductionnelles, sont repliées et assemblées en complexes protéiques avant d'être envoyées vers d'autres organelles, la membrane plasmique ou vers l'espace extracellulaire par la voie sécrétrice (Kaufmann, 1999). Ce processus de maturation protéique requiert plusieurs facteurs dont un environnement oxydant (formation des ponts disulfides), des concentrations adéquates en ATP et en calcium ainsi que la présence des protéines résidentes du RE (chaperonnes) (Gaut et Hendershot, 1993). Plus précisément, ces protéines chaperonnes s'associent, via les régions hydrophobes, aux protéines à conformation anormale ou en cours de synthèse afin de stabiliser leurs conformations énergétiquement instables et afin de prévenir leurs agrégations. Les protéines, qui n'ont pas subi le processus de maturation de façon adéquate, sont retenues au niveau du RE et éventuellement transportées au niveau du cytosol où elles sont dégradées par le protéasome processus connu sous le nom de la dégradation associée au réticulum endoplasmique (ERAD) (Kaufman, 2002).

Dans certaines conditions cytotoxiques, telles qu'une perturbation de l'homéostasie calcique, de l'équilibre d'oxydoréduction ou de la glycosylation, une privation en nutriments, une hypoxie et une augmentation de l'expression des protéines sécrétrices, il y a une perturbation du processus de repliement des protéines et ainsi une accumulation et agrégation des protéines à conformation anormale au niveau du RE. Dans ces conditions, les cellules sont en situation de stress du RE (Yan Jun et Hendershot, 2002). L'agrégation des protéines est toxique pour les cellules et elle est associée à plusieurs conditions pathologiques telles que l'ischémie, les maladies neurodégénératives et le diabète (Szegezdi *et al.*, 2006). Dans le but de limiter les dommages associés au stress du RE, les cellules sont en mesure de réagir en déclenchant la signalisation *unfolded protein response* (UPR). Cette réponse a pour but de rétablir la fonction physiologique du RE en augmentant les capacités cellulaires de repliement des protéines. Toutefois, lorsque le stress du RE est trop intense ou de trop longue durée, la réponse UPR entraîne la mort cellulaire par apoptose (Faitova *et al.*, 2006) (voir figures 1.10 et 1.11).

1.2.2.3.2 Réponse UPR et survie cellulaire

La réponse UPR permet de limiter l'accumulation des protéines à conformation anormale au niveau du RE. Les conséquences de cette réponse sont l'inhibition de la synthèse protéique ainsi que l'activation de l'expression des protéines chaperonnes du RE, des protéines impliquées dans la voie sécrétrice et des protéines associées au système de dégradation ERAD (Faitova *et al.*, 2006; Schroder et Kaufman, 2005; Yoshida, 2007a). La réponse UPR est essentielle dans certaines conditions physiologiques normales telles que la différenciation des plasmocytes et la régulation de la sécrétion de l'insuline dans les cellules pancréatiques β (Faitova *et al.*, 2006; Iwakoshi *et al.*, 2003; Scheuner *et al.*, 2001). Par conséquent, une perturbation de cette signalisation est à l'origine de plusieurs conditions pathologiques dont les maladies neurodégénératives, le diabète, l'athérosclérose et plusieurs autres (revu par Yoshida, 2007a). Chez les mammifères, la réponse UPR est traduite par trois récepteurs transmembranaires situés au niveau du RE : la protéine *PKR-like ER kinase* (PERK), l'*activating transcription factor 6* (ATF6) et l'endonucléase inositol requis 1 (IRE1). Dans les conditions normales, ces trois protéines sont maintenues à l'état inactif via leur association avec la protéine chaperonne du RE *immunoglobulin heavy chain-binding protein*

(Bip). Lors d'un stress du RE, l'accumulation des protéines mal conformées, dans la lumière du RE, entraîne la dissociation de Bip de ces trois molécules, ce qui active la transduction du signal UPR (voir figure 1.10) (Kohno, 2007; Schroder, 2006).

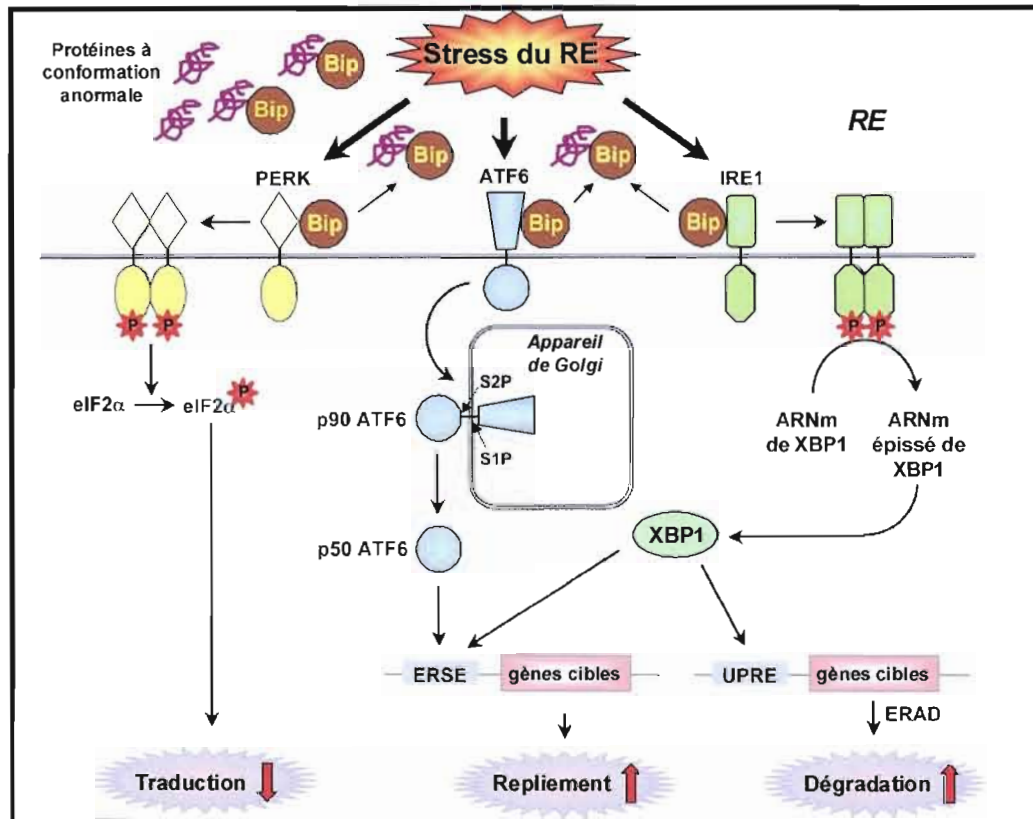


Figure 1.10 : La signalisation UPR. Le stress du RE induit la signalisation UPR qui est médiée par trois protéines du RE : *PKR-like ER kinase* (PERK), *activating transcription factor 6* (ATF6) et inositol requis 1 (IRE1). L'activation de PERK induit la phosphorylation de *eukaryotic translation initiation factor 2α* (eIF2α) ce qui cause l'inhibition de la traduction des protéines. Par ailleurs, le stress du RE permet la relocalisation de la protéine ATF-6 de 90kDa (p90 ATF-6) au niveau de l'appareil de Golgi, où elle est clivée par les site-1 protéase (SP-1) et site-2 protéase (SP-2) pour générer un facteur de transcription actif de 50kDa (p50 ATF-6). De plus, l'activité endoribonucléasique de l'IRE-1 actif catalyse l'excision d'un intron située au niveau de l'ARNm du gène codant pour la *X-box binding protein 1* (XBP1). Cet épissage change la phase de lecture de traduction et permet ainsi la synthèse d'un facteur de transcription actif. Les facteurs de transcriptions p50 ATF-6 et XBP-1 actifs sont transloqués dans le noyau où ils se lient au niveau du *ER stress response element* (ERSE) et du *unfolded protein response element* (UPRE) et activent la transcription des gènes codant pour les protéines chaperonnes du RE et pour les facteurs impliqués dans la dégradation des protéines à conformation anormale par le système de dégradation associé au RE (ERAD). Traduit et modifié de (Kitamura, 2008).

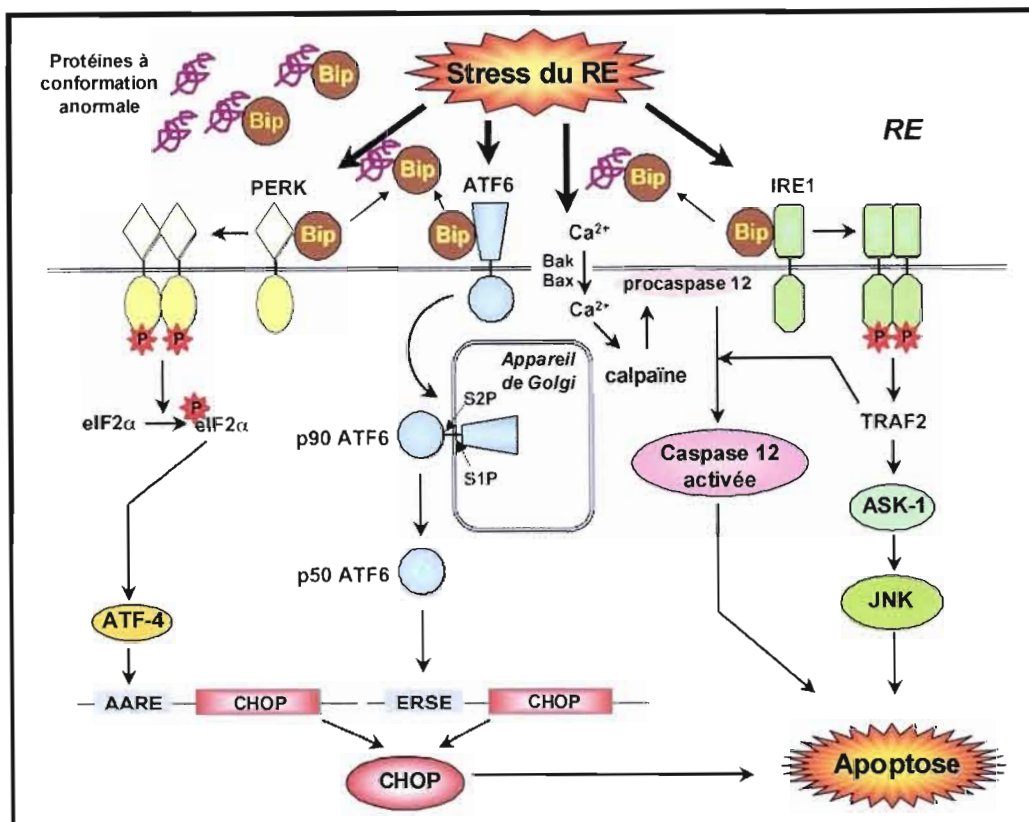


Figure 1.11 : L'induction de l'apoptose par un stress fort et prolongé du RE. L'activation de la voie PERK/eIF2 α favorise la synthèse du facteur de transcription ATF-4. Ce facteur de transcription se lie au niveau du *amino acid response element* (AARE) et induit l'expression de la protéine pro-apoptotique C/EBP protéine homologue (CHOP). Les voies d'ATF-6 et d'IRE-1 peuvent également induire l'expression de CHOP en activant l'ERSE. Durant le stress du RE, le calcium peut être libéré du RE, via les canaux Bak/Bax. La mobilisation du calcium au niveau du cytosol peut résulter en une activation des calpaïnes qui, à leur tour, peuvent activer, par clivage protéolytique, la caspase 12 (ou 4) située au niveau du RE. L'activation de la caspase 12 (ou 4) peut également résulter de son interaction avec IRE-1 et le facteur associé au TNFR (TRAF2). Une fois active, la caspase 12 propage le signal apoptotique en activant d'autres caspases effectrices de l'apoptose. Par ailleurs, l'interaction entre IRE-1 et TRAF2 permet le recrutement et l'activation de *apoptosis signal-regulated kinase* (ASK-1) suivie de l'activation de *c-Jun NH₂-terminal kinase* (JNK) qui est impliquée dans plusieurs voies pro-apoptotiques. Traduit et modifié de (Kitamura, 2008).

La kinase PERK est une protéine transmembranaire de type I qui possède un domaine N-terminal sensible aux protéines à conformation anormale, situé dans la lumière du RE, et un domaine cytoplasmique C-terminal à activité Ser/Thr kinase. Durant le stress du RE, la dissociation de Bip du domaine situé dans la lumière du RE, ainsi que la présence des protéines mal conformées permet l'activation de PERK via son oligomérisation suivie de son

autophosphorylation en trans (Bertolotti *et al.*, 2000; Kohno, 2007). Une fois active, la kinase PERK phosphoryle le résidu Ser51 de la sous-unité α du *eukaryotic translation initiation factor 2 α* (eIF2 α) (Harding *et al.*, 1999). Cette phosphorylation inhibe le facteur échangeur de nucléotides de guanine (eIF2B) qui recycle la forme inactive de eIF2-GDP en sa forme active eIF2-GTP. Ainsi, le faible taux de eIF2 actif empêche la formation du complexe d'initiation de la traduction ce qui atténue la synthèse des protéines et réduit l'apport supplémentaire des protéines dans le RE (Harding *et al.*, 1999; Ron et Walter, 2007). Toutefois, la traduction de certaines protéines peut être favorisée dans ces conditions de stress. C'est le cas, du *activation transcription factor 4* (ATF4) dont la synthèse augmente suite à l'activation de la voie PERK/eIF2 α . L'ARNm de ATF4 contient plusieurs séquences inhibitrices *upstream open reading frame* (uORF), dans la partie 5' non traduite, qui empêchent la traduction de l'*open reading frame* (ORF) principal de ATF4 dans les cellules normales. Dans les conditions de stress, le taux de eIF2 α actif est faible ce qui permet aux ribosomes d'atteindre l'ORF principal de ATF4 et d'initier la traduction de ce facteur de transcription (Harding *et al.*, 2000; Ron et Walter, 2007; Vatter et Wek, 2004; Yoshida, 2007a). Le facteur de transcription ATF4 favorise la survie cellulaire en activant la transcription des gènes impliqués dans le métabolisme des acides aminés, la réponse antioxydante, la réponse au stress ainsi que dans la sécrétion des protéines (Harding *et al.*, 2003). Toutefois, l'ATF4 semble également jouer un rôle pro-apoptotique en induisant l'expression de la protéine C/EBP protéine homologue (CHOP) (Ma *et al.*, 2002).

La deuxième voie qui est activée suite à l'accumulation des protéines mal repliées au niveau de la lumière du RE est celle qui implique le facteur de transcription ATF6 (voir figure 1.10). Ce facteur de transcription, exprimé sous forme de deux isomères ATF6 α et ATF6 β de distribution ubiquitaire, est une protéine transmembranaire de type II caractérisée par un domaine luminal C-terminal, sensible aux protéines mal conformées, et une portion cytoplasmique N-terminale contenant un domaine de liaison à l'ADN de type glissière à leucine *basic-leucine zipper* (bZIP) et un domaine d'activation transcriptionnelle (Bailey et O'Hare, 2007; Haze *et al.*, 2001; Haze *et al.*, 1999; Ron et Walter, 2007; Yoshida, 2007a). Durant le stress du RE, la dissociation de Bip de la protéine ATF6 permet l'exposition de deux signaux de localisation au niveau du Golgi permettant ainsi sa migration du RE vers

l'appareil de Golgi par le transport vésiculaire (Chen *et al.*, 2002; Shen *et al.*, 2002). Au niveau du compartiment de Golgi, l'ATF6 subit un double clivage protéolytique par les site-1 protéase (S1P) et site-2 protéase (S2P) qui libère la portion cytoplasmique d'ATF6 de 50kDa, p50 ATF6 (Chen *et al.*, 2002; Haze *et al.*, 2001; Haze *et al.*, 1999). Cette protéine tronquée est ensuite relocalisée au niveau du noyau où elle se lie au niveau des séquences *ER stress response element* (ERSE) et active la transcription des gènes cibles dont les protéines chaperonnes du RE telles que Bip, *glucose regulated protein 94* (Grp 94), calreticuline, la protéine disulfide isomérase (PDI) ainsi que le facteur de transcription *X box-binding protein 1* (XBP1) (Okada *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2000; Yoshida *et al.*, 1998). Par conséquent, l'activation d'ATF6 permet de rétablir l'homéostasie du RE en augmentant la capacité de repliement des protéines au niveau de ce compartiment.

L'IRE1 constitue la troisième protéine qui capte le stress du RE. Chez les mammifères cette protéine est exprimée sous forme de deux isoformes IRE1 α , qui est exprimé dans plusieurs tissus, et IRE1 β dont l'expression est restreinte au niveau des cellules épithéliales du système digestive (Tirasophon *et al.*, 1998; Urano *et al.*, 2000a; Wang *et al.*, 1998). L'IRE1 est, comme PERK, une protéine transmembranaire de type I contenant une région N-terminale sensible aux protéines mal repliées, située dans la lumière du RE, et une région cytoplasmique C-terminale contenant un domaine à activité Ser/Thr kinase et un domaine à activité endoribonucléase (Cox *et al.*, 1993; Mori *et al.*, 1993; Ron et Hubbard, 2008). La dissociation de Bip ainsi que la présence des protéines à conformation anormale, dans les conditions de stress du RE, entraînent l'activation d'IRE1 via son oligomérisation suivie de son autophosphorylation en trans. Par un mécanisme encore mal compris, cette autophosphorylation du domaine à activité kinase d'IRE1 permet l'expression de son activité endoribonucléasique qui est responsable de l'épissage de l'ARNm codant pour le facteur de transcription XBP1 (Lee *et al.*, 2008; Ron et Hubbard, 2008; Tirasophon *et al.*, 1998). Dans l'ARNm non épissé de XBP1, le domaine de liaison à l'ADN ainsi que le domaine d'activation de la transcription sont codés dans deux ORF différents et la protéine traduite à partir de cet ARNm contient seulement le domaine de liaison à l'ADN et est incapable d'activer la transcription (Yoshida, 2007b; Yoshida *et al.*, 2001). Lors d'un stress du RE, l'épissage non conventionnel de l'ARNm de XBP1, par IRE1 actif, entraîne une excision

d'un intron de 26 nucléotides qui relie les deux ORF permettant ainsi la synthèse d'un XBP1 actif contenant les domaines fonctionnels (Yoshida, 2007b; Yoshida *et al.*, 2003). La protéine XBP1 active est un facteur de transcription à domaine bZIP qui se lie sur des séquences ERSE et *unfolded protein response element* (UPRE) et active la transcription des gènes cibles dont les protéines du système ERAD (EDEP, HRD1, Derlin-2 et Derlin-3) (Oda *et al.*, 2006), les protéines chaperonnes du RE (Bip, Grp 58 et PDI-P5) (Lee *et al.*, 2003) et les protéines associée à la voie sécrétrice (SEC23B, SEC24C, SRP54 et TRAM1) (Shaffer *et al.*, 2004; Yoshida, 2007b). Cette activation transcriptionnelle permet de rétablir l'homéostasie du RE en augmentant les capacités de repliement des protéines ainsi que de dégradation des protéines dénaturées au niveau du RE. De plus, les études plus récentes indiquent que l'endonucléase IRE1 joue également un rôle dans l'atténuation de la synthèse des protéines en clivant les ARNm destinés au RE ainsi que la sous-unité 28S du ribosome (Hollien et Weissman, 2006; Iwawaki *et al.*, 2001).

En conclusion, la réponse UPR, traduite par l'activation des trois molécules sensibles au stress du RE, PERK, ATF6 et IRE1, induit une inhibition de la synthèse des protéines et augmente la capacité cellulaire de repliement des protéines ainsi que l'élimination des protéines mal repliées afin de protéger le RE et permettre ainsi la survie des cellules dans les conditions de stress. Toutefois, lorsque le stress est prolongé ou sévère, la réponse UPR n'est pas en mesure de rétablir l'homéostasie du RE et peut aboutir à la mort cellulaire par apoptose dans le but de protéger l'organisme (voir figure 1.11) (Boyce et Yuan, 2006; Lai *et al.*, 2007; Schroder, 2006; Szegezdi *et al.*, 2006).

1.2.2.3.3 Réponse UPR et apoptose

Lorsque les mécanismes de survie de la réponse UPR sont incapables de prendre en charge l'excès de protéines mal repliées dans le RE, les trois branches de la signalisation UPR contribuent à l'induction de l'apoptose. Plusieurs mécanismes de transmission des signaux apoptotiques induits par le stress du RE ont été proposés incluant l'induction du facteur de transcription CHOP, l'activation de la kinase *c-Jun NH₂-terminal kinase* (JNK), la libération du calcium à partir du RE ainsi que l'activation des protéases (voir figure 1.11) (Lai *et al.*, 2007; Szegezdi *et al.*, 2006; Yoshida, 2007a).

Le facteur de transcription CHOP, membre de la famille des facteurs de transcription *CCAAT/enhancer binding proteins* (C/EBP), est composé de deux domaines fonctionnels : un domaine d'activation de la transcription N-terminal et un domaine de liaison à l'ADN bZIP C-terminal (Oyadomari et Mori, 2004; Ron et Habener, 1992). La protéine CHOP, via les interactions avec les domaines bZIP, forme des hétérodimères avec les autres membres de la famille C/EBP ce qui supprime leur liaison sur les sites C/EBP au niveau de l'ADN et favorise la liaison aux sites alternatives pour l'activation de la transcription des gènes cibles (Oyadomari et Mori, 2004). Les cellules normales sont caractérisées par une faible expression ubiquitaire de la protéine CHOP. Dans les conditions de stress du RE, les trois facteurs de transcription, activés durant la réponse UPR, induisent la transcription du gène codant pour la protéine CHOP en se liant sur des séquences *amino acid response element* (AARE) (ATF4) et ERSE (ATF6 et XBP1) de son promoteur (Harding *et al.*, 2000; Lai *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2002; Okada *et al.*, 2002). Le rôle de CHOP dans l'induction de l'apoptose reste encore à élucider, toutefois il est connu que ce facteur de transcription régule à la hausse plusieurs gènes cibles impliqués dans l'apoptose dont arrêt de croissance et dommage à l'ADN 34 (GADD34), *ER oxydoreductine 1* (ERO1) (Marciniak *et al.*, 2004), DR5 (Yamaguchi et Wang, 2004), Bim (Puthalakath *et al.*, 2007) et l'anhydrase carbonique VI (Sok *et al.*, 1999; Yoshida, 2007a). Par ailleurs, le caractère pro-apoptotique de la protéine CHOP peut être associé à sa capacité à réguler à la baisse l'expression des protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 et d'augmenter la génération des ROS dans les cellules via la déplétion du glutathion (Lai *et al.*, 2007; McCullough *et al.*, 2001; Yamaguchi et Wang, 2004).

Une autre voie apoptotique, induite par le stress du RE, implique l'activation de la Ser/Thr kinase JNK. Durant le stress du RE, la protéine adaptatrice facteur 2 associé au TNFR (TRAF2) se lie au domaine cytoplasmique d'IRE1 actif et recrute la protéine *apoptosis signal-regulated kinase 1* (ASK1). Dans les conditions normales, la kinase ASK1 est maintenue à l'état inactif via son association avec la Trx. Dans les conditions de stress, l'oxydation de Trx libère ASK1 qui est transloquée au niveau du RE où elle interagit avec TRAF2 (Matsuzawa *et al.*, 2002). La formation du complexe de haut poids moléculaire

IRE1/TRAF2/ASK1 permet l'activation de la Ser/Thr kinase ASK1 qui à son tour déclenche l'activation de la protéine kinase activée par mitogènes (MAPK) JNK (Matsuzawa *et al.*, 2002; Nishitoh *et al.*, 2002; Urano *et al.*, 2000b). Plus précisément, la kinase ASK1 est une MAP kinase kinase kinase (MAP3K) qui active, par phosphorylation, les MAP kinase kinase (MAP2K), MKK4 et 7, qui à leur tour phosphorylent et activent la MAPK, JNK (Dhanasekaran et Reddy, 2008; Takeda *et al.*, 2008; Urano *et al.*, 2000b). La transduction du signal apoptotique, par JNK, s'effectue au niveau du noyau ainsi que dans le cytosol. Au niveau du noyau, JNK active, par phosphorylation, le facteur de transcription c-Jun qui forme le complexe AP-1 et augmente ainsi l'expression de plusieurs gènes pro-apoptotiques dont TNF- α , Fas-L et Bak (Dhanasekaran et Reddy, 2008; Fan et Chambers, 2001). Également, JNK peut induire l'expression des gènes pro-apoptotiques en phosphorylant p53 et de p73. Ceci entraîne la stabilisation de ces facteurs de transcription qui sont impliqués dans l'induction de l'expression de plusieurs gènes pro-apoptotiques dont *p53-upregulated modulator of apoptosis* (PUMA) et Bax (Dhanasekaran et Reddy, 2008; Fuchs *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 2007; Oleinik *et al.*, 2007). Par ailleurs, la protéine JNK active module l'activité des protéines de la famille de Bcl-2 au niveau de la mitochondrie et du RE (Chauhan *et al.*, 2003; Kharbanda *et al.*, 2000; Szegezdi *et al.*, 2006). En effet, JNK inhibe la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Une fois phosphorylée, la protéine Bcl-2 n'est plus en mesure de lier et de séquestrer les protéines pro-apoptotiques BH3 (Yamamoto *et al.*, 1999) ainsi que de réguler le flux calcique au niveau de la membrane du RE (Bassik *et al.*, 2004). L'activation de JNK cible également l'activation des protéines pro-apoptotiques BH3 dont Bim, Bmf et Bad (Donovan *et al.*, 2002; Lei et Davis, 2003). Une fois activées, ces protéines pro-apoptogènes peuvent promouvoir l'apoptose en activant d'autres protéines pro-apoptotiques Bak et Bax ou en inhibant les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL (Dhanasekaran et Reddy, 2008; Lei et Davis, 2003).

Par ailleurs, le stress du RE entraîne la libération du calcium à partir du RE. Cette mobilisation calcique est régulée par le ratio entre les protéines pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2 (Bax, Bak, Bim, Bik, PUMA, NOXA), qui favorisent la libération du calcium à partir du RE (Mathai *et al.*, 2005; Mileva, 1976; Shibue *et al.*, 2006), et les membres anti-apoptotiques (Bcl-2 et Bcl-XL) qui inhibent ce flux calcique (Hetz, 2007; Mileva, 1976).

Plusieurs signaux, induits par le stress du RE, causent l'activation transcriptionnelle ou post-traductionnelle des protéines BH3 qui s'accumulent au niveau de la membrane du RE. Ces protéines favorisent l'oligomérisation des protéines pro-apoptotiques aux domaines multiples Bax et Bak qui forment des pores au niveau de la membrane du RE permettant ainsi la libération du calcium (Lai *et al.*, 2007; Zong *et al.*, 2003). Une fois dans le cytosol, ce cation divalent peut induire plusieurs événements pro-apoptotiques. En effet, l'entrée massive du Ca^{2+} au niveau de la mitochondrie induit l'ouverture du PTP suivie de la libération du cyt c et de l'activation de la caspase 9 (Bernardi, 1999; Xu *et al.*, 2005). Une fois activée, cette caspase initiateur active, par clivage protéolytique, d'autres caspases effectrices de l'apoptose (caspases 3 et 7). Également, le calcium propage le signal apoptotique en activant la calcineurine (protéine kinase/phosphatase dépendante du calcium) qui déphosphoryle et active Bad (Wang *et al.*, 1999) et le facteur de transcription pro-apoptotique de la famille NFAT (Youn *et al.*, 1999), l'oxyde nitrique synthétase qui induit le stress nitrosatif (Orrenius *et al.*, 2003), l'endonucléase Ca^{2+} dépendante qui implique dans la dégradation de l'ADN, la phospholipase A2 et les calpaïnes (Orrenius *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2005).

Les calpaïnes sont des protéases à cystéine de type papaïne dont l'activité est régulée par la concentration de calcium. Cette famille d'enzymes, codée par les gènes CAPN, comprends plusieurs isoformes tissus-spécifiques (n-calpaïne) et de deux formes de distribution ubiquitaire (μ -calpaïne et m-calpaïne) (Croall et Ersfeld, 2007; Demarchi et Schneider, 2007). Chaque isoforme est exprimé au niveau du cytosol sous forme de pro-enzyme constituée d'une sous-unité catalytique de 80kDa, spécifique de chaque isoenzyme, et d'une sous-unité régulatrice de 30kDa (calpaïne 4), identique à tous les isoformes. Les calpaïnes sont impliquées dans les réactions inflammatoires, la nécrose ainsi que dans la transduction du signal apoptotique. L'activation des calpaïnes s'effectue suite à une augmentation de la concentration de Ca^{2+} cytosolique qui induit des changements conformationnels du zymogène aboutissant ainsi à sa dissociation. Les contraintes physiques ainsi relâchées permettent l'alignement adéquat du site actif nécessaire à l'activité enzymatique des calpaïnes. L'atténuation de l'activité des calpaïnes est observée lors d'une baisse du niveau de calcium ou suite à son interaction avec la calpastatine (protéine inhibitrice) (Baud *et al.* 2003 ; Pelletier et Vallette, 2001). Une fois activées, les calpaïnes

participent dans l'apoptose en activant ou en inhibant, par clivage protéolytique, plusieurs substrats tels que les protéines de la famille de Bcl-2 (Bcl-XL, Bad et Bid), protéines de structure du cytosquelette (fodrine, actine, filamine et taline) et la poly-(ADP-ribose)-polymérase (PARP) (Johnson, 2000 ; Orrenius *et al.* 2003). Les calpaïnes actives sont également transloquées au niveau de la membrane du RE où elles clivent et activent les caspases 12 (murine) et 4 (humaine) (Nakagawa et Yuan, 2000) ; Gupta, 2005 ; Rutkowski et Kaufman, 2004 ; Szegezdi *et al.* 2003).

La caspase 12, localisée du côté cytoplasmique du RE, joue un rôle central dans la transduction du signal apoptotique induit par le stress du RE et une délétion de cette caspase initiateur protège les cellules contre l'apoptose associée au stress du RE (Hitomi *et al.*, 2004; Nakagawa *et al.*, 2000). La caspase 12 fonctionnelle est exprimée chez les rongeurs toutefois sa présence chez l'humain reste controversée. En effet, la transcription du gène humain codant pour la procaspase 12 donne lieu, par épissage alternatif, à neuf ARNm qui contiennent des codons STOP prématurés et des mutations qui inhibent l'activité de la caspase 12 (Fischer *et al.*, 2002). Les études d'alignement des séquences d'ADN montrent que la caspase 4 constitue un homologue humain de la caspase 12 des rongeurs et son implication dans l'apoptose induite par le stress du RE a été constatée dans plusieurs modèles cellulaires (Hitomi *et al.*, 2004; Lopez-Anton *et al.*, 2006; Yukioka *et al.*, 2008). D'un autre côté, plusieurs études émettent l'hypothèse selon laquelle les codons STOP prématurés dans l'ARNm de la procaspase 12 humaine peuvent être évités par la machinerie de traduction cellulaire et produire ainsi une caspase 12 fonctionnelle. D'ailleurs, l'activation de la caspase 12 a été rapportée dans plusieurs modèles cellulaires humains (Bitko et Barik, 2001; Rao *et al.*, 2001; Szegezdi *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2007).

Le mécanisme d'activation de la caspase 12, durant le stress du RE, implique un clivage protéolytique qui permet d'éliminer le prodomaine CARD suivie d'un autoclivage qui sépare les deux sous-unités catalytiques (Roy *et al.*, 2008). Mise à part le clivage par les calpaïnes, l'élimination du prodomaine peut être provoquée par la caspase 7. Durant le stress du RE, cette enzyme protéolytique est recrutée au niveau de la membrane du RE où elle s'associe avec la procaspase 12 et la protéine Bip qui inhibe l'activité de la caspase 7 et la

libération de la caspase 12 au niveau du cytosol. Lorsque le signal de stress est intense, la caspase 7 interagit avec la caspase 12 et induit le clivage de son prodomaine favorisant ainsi une autoactivation subséquente (Rao *et al.*, 2001; Rao *et al.*, 2002; Reddy *et al.*, 2003). Un autre mécanisme d'activation de la procaspase 12 implique la protéine adaptatrice TRAF2. Dans les conditions normales, TRAF2 est associée à la procaspase 12 ce qui empêche son activation. Lors d'un stress du RE, TRAF2 se dissocie de la procaspase 12 suite à son interaction avec la protéine IRE1. Ceci entraîne l'homodimérisation ou l'oligomérisation de la procaspase 12 favorisant ainsi son activation (Yoneda *et al.*, 2001). En ce qui concerne la caspase 4, son activation implique une homodimérisation et un clivage qui séparent les différents domaines (Karki *et al.*, 2007). Comme dans le cas de la caspase 12, la caspase 4 peut être activée par les calpaïnes et son activité est atténuée par la protéine chaperonne Bip (Jiang *et al.*, 2007; Oda *et al.*, 2008). Une fois activées, les caspases 12 et 4 sont libérées au niveau du cytosol où elles activent, par clivage protéolytique, les caspases 9 et 3 induisant ainsi l'apoptose indépendante de la voie mitochondriale (Hitomi *et al.*, 2004; Morishima *et al.*, 2002; Yukioka *et al.*, 2008).

Des études récentes montrent que l'acroléine induit un stress du RE et déclenche la signalisation UPR dans les cellules HUVEC et dans les cellules Swiss 3T3 (fibroblastes embryonnaires de souris) (Hengstermann et Muller, 2007; Haberzettl *et al.*, 2009). Toutefois, le rôle du stress du RE dans l'induction de l'apoptose par l'acroléine n'est pas encore compris.

1.3 Présentation du projet

1.3.1 Introduction

L'acroléine est un aldéhyde α,β -insaturé très toxique qui est omniprésent dans l'environnement. Les humains sont inévitablement exposés à ce composé toxique dans plusieurs situations. En industrie, l'acroléine est employée comme produit de départ dans plusieurs réactions chimiques (synthèse de l'acide acrylique, méthionine et de glutaraldéhyde) et comme herbicide aquatique. Par ailleurs, l'acroléine peut être générée lors de la combustion de la matière organique. Par conséquent, cet aldéhyde est présent dans les gaz d'échappement des véhicules, dans le smog et a été détecté en grandes quantités dans la

fumée de cigarette (Kehrer et Biswal, 2000; Stevens et Maier, 2008). L'acroléine est également présente dans les aliments et sa concentration peut être augmentée avec la cuisson et la friture de ces derniers. Dans notre corps, l'acroléine est produite lors de la peroxydation des lipides membranaires qui se déroule dans les conditions de stress oxydatif, ainsi qu'au niveau des sites inflammatoires (Anderson *et al.*, 1997; Uchida *et al.*, 1998a). Par conséquent, cette substance toxique est impliquée dans plusieurs conditions pathologiques, associées au stress oxydatif et à l'inflammation accrus, telles que les maladies pulmonaires, les maladies neurodégénératives, l'athérosclérose ainsi que l'insuffisance rénale (Leikauf *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 1999; Uchida, 1999). Par ailleurs, l'acroléine constitue un de plusieurs métabolites du cyclophosphamide (agent anti-cancéreux) et peut être impliquée dans son action anti-cancéreuse ainsi que dans ses effets toxiques (Alarcon, 1976; Furlanut et Franceschi, 2003 ; Alarcon, 1976). L'omniprésence de l'acroléine dans l'environnement ainsi que le grand impact qu'exerce cette substance toxique sur la santé humaine explique la nécessité de comprendre ses mécanismes de toxicité.

Suite à une inhalation, l'acroléine cause plusieurs lésions pathologiques associées aux maladies pulmonaires inflammatoires (asthme et MPOC) dont la destruction de l'épithélium des voies respiratoires (Leikauf *et al.*, 2002). Il est connu que la fumée de cigarette constitue le premier facteur favorisant le développement de ces maladies respiratoires chroniques (Environnement Canada, 2007). L'acroléine est un constituant majeur de la fumée de cigarette (3 à 220 µg/cigarette) et la littérature rapporte que cette substance toxique est impliquée dans plusieurs pathologies associées au tabagisme (Feng *et al.*, 2006; Mercado et Jaimes, 2007; van der Toorn *et al.*, 2007). Les études précédentes montrent que la toxicité de l'acroléine, au niveau de l'épithélium respiratoire, peut être attribuée à sa capacité d'induire la mort apoptotique des cellules pulmonaires (Borchers *et al.*, 2008; Borchers *et al.*, 2007; Nardini *et al.*, 2002; Thompson et Burcham, 2008b). Notre étude consiste à étudier les mécanismes cellulaires de l'apoptose induits par l'acroléine dans les cellules pulmonaires A549.

1.3.2 Modèle cellulaire

Comme discuté plus haut, plusieurs types de cellules sont touchés par une exposition à l'acroléine. La génération de l'acroléine dans les conditions de stress oxydatif, peut causer des dommages aux cellules neuronales (LoPachin *et al.*, 2007), cellules endothéliales (Go *et al.*, 2007; Park et Taniguchi, 2008) ainsi qu'aux cellules glomérulaires du mésangium (Suzuki et Miyata, 1999 et Suzuki *et al.*, 1999). Par ailleurs, le premier organe ciblé par une exposition à l'acroléine présente dans l'environnement est le poumon. Plus précisément, l'acroléine est connue pour avoir des effets toxiques sur les neutrophiles, les macrophages, les lymphocytes ainsi que les fibroblastes des voies respiratoires (Finkelstein *et al.*, 2001; Finkelstein *et al.*, 2005; Borchers *et al.*, 2007; Carnevali *et al.*, 1998). L'acroléine est également responsable de la destruction de l'épithélium des voies respiratoires en causant la mort apoptotique des cellules épithéliales pulmonaires (Borchers *et al.*, 2008; Borchers *et al.*, 2007; Nardini *et al.*, 2002). Notre étude s'intéresse aux effets toxiques de l'acroléine sur les cellules pulmonaires épithéliales.

Pour évaluer les mécanismes de toxicité associés à l'acroléine au niveau de l'épithélium respiratoire, nous avons choisi la lignée cellulaire A549. Cette lignée cellulaire a été développée en 1972 par Giard et collaborateurs à partir d'explants d'un carcinome pulmonaire trouvé chez un homme Caucasien âgé de 58 ans (Giard *et al.*, 1973). Ces cellules présentent plusieurs caractéristiques morphologiques des cellules épithéliales alvéolaires de type II dont les corps lamellaires (Foster *et al.*, 1998; Lieber *et al.*, 1976; Roggen *et al.*, 2006).

La lignée cellulaire A549 est largement utilisée dans l'évaluation des effets toxiques des polluants atmosphériques inhalés (Forbes et Ehrhardt, 2005) dont la poussière (Wilson *et al.*, 2000), la fumée de cigarette (Kaushik *et al.*, 2008) ainsi que les gaz d'échappement des véhicules (Danielsen *et al.*, 2008). C'est une lignée qui est stable et qui est bien caractérisée et plusieurs données concernant les groupements thiols et l'expression des gènes sont disponibles (Kehrer et Biswal, 2000).

L'épithélium alvéolaire occupe plus de 90% de la surface totale des poumons et il regroupe les cellules épithéliales de type I et II (Yang *et al.*, 2000). Les pneumocytes de type I sont des cellules différenciées et ils recouvrent plus de 90% de la surface alvéolaire. Cela peut constituer un désavantage à l'utilisation des cellules A549 (type II) pour l'étude des mécanismes de toxicité. Toutefois, il est connu que les cellules épithéliales de type II sont les progénitures des cellules de type I, elles sont plus nombreuses et plus résistantes aux agressions et elles jouent un rôle dans plusieurs fonctions dont la synthèse et la sécrétion du surfactant, le métabolisme des xénobiotiques, la sécrétion des cytokines et des facteurs de croissance ainsi que la régénération de l'épithélium alvéolaire suite à une lésion. Les études de caractérisation des cellules A549 montrent que cette lignée a conservé ces fonctions biochimiques des cellules de type II (Bates *et al.*, 2008; Foster *et al.*, 1998; Geiser, 2003). Une autre limitation de notre modèle cellulaire est le fait que l'expression de certains gènes peut être modifiée dans la lignée cellulaire A549 par rapport aux cellules alvéolaires normales. C'est le cas de la métalloprotéinase 15 qui dégrade la matrice extracellulaire. Cela pourrait interférer dans le processus de transition des cellules de type II en cellules de type I *in vitro* (Roggen *et al.*, 2006).

Parmi d'autres modèles cellulaires utilisés pour les études de toxicité au niveau de l'épithélium pulmonaire citons les lignées cellulaires primaires des cellules normales épithéliales bronchiques humaines et des cellules normales épithéliales nasales. *In vitro*, ces modèles cellulaires sont les plus proches des voies aériennes humaines. Toutefois, le manque de disponibilité des tissus ainsi que la grande variabilité entre les donneurs rend les études de toxicité dans ces cellules difficiles (Roggen *et al.*, 2006). Il existe également des lignées cellulaires bronchiales humaines immortalisées telles que les lignées transformées avec l'antigène grand T provenant du virus simien 40 (16HBE14o⁺ et BEAS-2B) et la lignée dérivée d'un adénocarcinome bronchique Calu-3. Cependant, dans les études de toxicité, l'utilisation des cellules alvéolaires est plus pertinente que celle des cellules nasales et bronchiales à cause de la grande surface de l'épithélium alvéolaire et de la longue durée du processus d'élimination des substances toxiques (Roggen *et al.*, 2006).

1.3.3 Objectifs spécifiques

Les études précédentes suggèrent que l'acroléine induit l'apoptose dans plusieurs lignées cellulaires telles que les cellules épithéliales pulmonaire (HBE1) (Nardini *et al.*, 2002), les cellules d'adénocarcinome pulmonaire A549 (Hoshino *et al.*, 2001; Thompson et Burcham, 2008a,b; Roy *et al.*, 2009); les macrophages alvéolaires humains (Li *et al.*, 1997), les cellules humaines endothéliales de la veine ombilicale (Misonou *et al.*, 2006) ainsi que les kératinocytes humains (Takeuchi *et al.*, 2001). À ce sujet, les études effectuées dans notre laboratoire montrent que l'acroléine induit l'apoptose en activant la voie mitochondriale (Tanel et Averill-Bates, 2005) et la voie du récepteur de mort Fas (Tanel et Averill-Bates, 2007a) dans les cellules CHO. De plus, il est connu que l'apoptose induite par l'acroléine, dans les cellules CHO, implique l'activation des MAPK p38 et la kinase régulatrice de signal extracellulaire (ERK) (Tanel et Averill-Bates, 2007c). Récemment, les études de notre laboratoire ont également montré que l'acroléine induit l'apoptose dans les cellules d'adénocarcinome pulmonaire A549 en activant la voie mitochondriale et la voie de récepteur de mort (Roy *et al.*, 2009).

Par ailleurs, il est connu que l'acroléine perturbe l'état d'oxydoréduction de la cellule (déplétion de glutathion) et cause l'alkylation des résidus cystéines des protéines en altérant ainsi leurs structures et leurs fonctions. La disulfure isomérase est l'une des nombreuses enzymes modifiées par l'acroléine. Cette enzyme est impliquée dans la maturation des protéines au niveau du RE en catalysant la formation des ponts disulfures (Carbone *et al.*, 2005; Liu et Sok, 2004). Ceci interfère avec le processus normal de repliement des protéines et peut favoriser l'accumulation des protéines à conformation anormale au niveau du RE, une condition de stress du RE. D'ailleurs, récemment, les études de Bhatnagar et collègues ont montré que l'acroléine induit un stress du RE et déclenche la signalisation UPR qui est impliquée dans l'activation des cellules humaines endothéliales de la veine ombilicale (Haberzettl *et al.*, 2009). De plus, Hengstermann et Muller (2007) ont déterminé que l'acroléine est en partie responsable du stress du RE induit par la fumée de cigarette dans les cellules Swiss 3T3 (Hengstermann et Muller, 2007). Toutefois, l'implication du stress du RE dans l'induction de l'apoptose par l'acroléine n'est pas connue.

La revue de la littérature permet d'émettre une hypothèse. Il est possible que l'apoptose induite par l'acroléine dans les cellules A549, en plus de la voie de récepteur de mort et de la voie mitochondriale, impliquerait la voie du RE. Par conséquent l'objectif principal de notre étude consiste à vérifier le mécanisme d'activation de l'apoptose par la voie du RE dans les cellules d'adénocarcinome pulmonaire A549 exposées à l'acroléine. Plus spécifiquement, dans le cadre de notre projet nous avons poursuivi les objectifs suivants :

1. Déterminer si l'acroléine cause un stress du RE et déclenche la réponse UPR.
2. Déterminer si le stress induit par l'acroléine est assez rigoureux pour provoquer l'apoptose par la voie du RE dans les cellules A549.
3. Vérifier si l'apoptose induite par l'acroléine implique le calcium et si ce dernier est responsable de l'activation des calpaïnes.
4. Étudier l'implication des caspases 12 et 4 associées au stress du RE dans l'apoptose induite par l'acroléine ainsi que déterminer le mécanisme d'activation de ces protéases.

1.3.4 Approches expérimentales

Tout d'abord, l'étude de l'induction de la mort cellulaire par l'acroléine dans les pneumocytes A549 a été effectuée. La condensation de la chromatine, une caractéristique morphologique de l'apoptose, a été observée par microscopie à fluorescence à l'aide du double marquage Hoechst 33258/Iodure de propidium (PI). L'étude de l'apoptose, induite par l'acroléine, a également été suivie en observant les changements biochimiques associés à ce type de mort cellulaire. Ainsi, la modification de la structure membranaire incluant l'externalisation de la phosphatidylsérine (PS) a été analysée par cytométrie de flux suite au double marquage des cellules pulmonaires avec annexine V/PI. D'autres changements biochimiques associés à la phase d'exécution de l'apoptose ont également été étudiés, dont l'activation des caspases effectrices 3 et 7, par fluorimétrie à l'aide des substrats peptidiques couplé à un fluorochrome, ainsi que le clivage de leur substrat physiologique ICAD qui a été mis en évidence par immunobuvardage.

Ensuite, pour déterminer si l'acroléine induit la signalisation UPR, nous avons étudié l'expression des protéines sensibles au stress du RE. Ainsi, l'induction de l'expression de la protéine chaperonne Bip et CHOP, la phosphorylation des protéines PERK et d'IRE1 α ainsi que le clivage de la protéine ATF6 α ont été mises en évidence par immunobuvardage.

Finalement, afin d'évaluer si le stress du RE induit par l'acroléine est assez rigoureux pour provoquer l'apoptose dans les cellules A549, nous avons étudié les différentes composantes de la voie du RE. Tout d'abord, la mobilisation du calcium libre a été suivie par cytométrie de flux à l'aide de la sonde fluo-3-AM. Ensuite, l'activation des enzymes associées à la voie du RE dont les calpaïnes, ainsi que les caspases 12 et 4 a été étudiée par fluorimétrie et par immunobuvardage en observant le clivage de ces enzymes et de la calpastatine, inhibiteur physiologique des calpaïnes. De plus, le mécanisme d'activation des calpaïnes et des caspases 12 et 4, associées à la voie du RE, ont été mis en évidence à l'aide du chélateur de calcium BAPTA-AM ainsi que de l'inhibiteur des calpaïnes. Comme dernière étape, pour confirmer l'implication du calcium, des calpaïnes, de la caspase 12 et 4 dans l'apoptose induite par l'acroléine, des inhibiteurs de ces enzymes ont été employés dans l'étude de la condensation de la chromatine.

Ainsi, l'acroléine, en interférant avec le processus normal de repliement des protéines, pourrait causer un stress du RE qui éventuellement conduira à l'apoptose par la voie du RE. Plus précisément, l'apoptose induite par l'acroléine pourrait être la conséquence de l'activation des trois protéines (PERK, IRE1 α , ATF6 α) impliquées dans la réponse UPR suite à l'induction du facteur de transcription pro-apoptogène CHOP. Par ailleurs, l'induction du stress du RE devrait se traduire en un flux calcique qui causera l'activation des calpaïnes et des caspases 12 et 4. Ces caspases propageront le signal apoptotique en activant d'autres caspases effectrices de l'apoptose. Par conséquent, une inhibition de l'apoptose induite par l'acroléine est attendue par le chélateur de calcium BAPTA-AM ainsi que les inhibiteurs des calpaïnes, et des caspases 12 et 4.

Cette étude permettra d'éclaircir davantage les mécanismes cellulaires impliqués dans la réponse cellulaire suite à une exposition d'acroléine qui est un polluant environnemental et un électrophile endogène. De plus, nos résultats pourraient être utiles dans l'évaluation des mécanismes impliqués dans le développement de plusieurs conditions pathologiques associées à l'acroléine plus spécifiquement les lésions de l'épithélium respiratoire causées par l'inhalation de la fumée de cigarette. Étant donné que l'être humain est inévitablement exposé à l'acroléine et que cet aldéhyde toxique est impliqué dans plusieurs conditions pathologiques, il est important de poursuivre la recherche sur les mécanismes de toxicité induite par l'acroléine.

CHAPITRE II MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Culture cellulaire

Les cellules A549 (*American Type Culture Collection* (ATCC) no CCL-185) ont été cultivées en monocouche dans le milieu DMEM (Invitrogen Canada, Burlington, ON, Canada) contenant 10% de FBS (Invitrogen Canada) et 1% de pénicilline (50 U/ml)-streptomycine (50 µg/ml) (Flow Laboratories, Mississauga, ON, Canada). La culture cellulaire a été effectuée dans les flacons de culture (Sarstedt, St Laurent, QC, Canada), dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO₂, à 37 °C. Afin de maintenir un pH adéquat et un apport en nutriments, le milieu de culture a été changé 24 heures avant l'expérience. Pour les études expérimentales, les cellules confluentes (trois à quatre jours de culture) ont été lavées avec du tampon salin de phosphate (PBS) et décollées à l'aide de la trypsine (0,5 mg/ml)/EDTA (0,2 mg/ml). Ensuite, les cellules ont été lavées par centrifugation (1000 x g, 3 minutes) et ont été resuspendues dans le milieu α-MEM contenant 10% de FBS pour les analyses. Les cellules des passages 3 à 10 (après la décongélation des vials reçu de l'ATCC) ont été utilisées pour les expériences.

2.2 Traitement des cellules A549 avec l'acroléine

Étant donné que l'acroléine est très électrophile, elle est caractérisée par une importante réactivité avec les nucléophiles du milieu de culture (Thompson et Burcham, 2008b). Les études précédentes montrent que l'acroléine réagit avec les constituants du milieu DMEM (Grafstrom, 1990; Horton *et al.*, 1999). Pour ces raisons, pour le traitement nous avons choisi le milieu α-MEM qui semble moins interagir avec l'acroléine (Tanel et Averill-Bates, 2005). De plus, le traitement de l'acroléine est dépendant de la densité cellulaire (Horton *et al.*, 1997). Afin de maintenir une densité constante, la suspension cellulaire a été ajustée à une concentration de 1×10^6 de cellules/ml et les cellules ont ensuite été exposées à différentes concentrations d'acroléine (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, États-Unis) (0-200 µM) durant 30 minutes, 2 et 4 heures à 37 °C. Un autre point à considérer est la

volatilité de l'acroléine. Dans nos expériences, le traitement d'acroléine a été effectué dans les tubes hermétiquement fermés ce qui évite l'échappement d'acroléine. Ainsi, afin de maintenir la densité cellulaire constante et d'éviter l'échappement d'acroléine, nous avons effectué le traitement avec des cellules A549 en suspension. Nous n'avons pas mesuré la demi-vie d'acroléine dans notre milieu de traitement. Toutefois, Zhang et Forman (2008) suggèrent que dans le milieu Ham's F12 contenant des hormones et des facteurs de croissance, la demi-vie d'acroléine est de cinq minutes à la température de la pièce. Par conséquent, les véritables concentrations d'acroléine auxquelles les cellules ont été continuellement exposées sont probablement inférieures aux concentrations indiquées (Zhang et Forman, 2008).

En raison de la grande réactivité de l'acroléine, il est difficile de mesurer la concentration de ce toxique dans les fluides physiologiques humains. En mesurant les résidus lysines modifiés par l'acroléine, Uchida et collaborateurs (1999) ont estimé que l'acroléine peut atteindre une concentration de 50 μM dans le sérum d'un sujet sain (Satoh *et al.*, 1999). En employant la même méthode, Igarashi et collègues (2003) ont mesuré une concentration de 180 μM de l'acroléine conjuguée aux protéines dans le sérum des patients souffrant d'insuffisance rénale (Sakata *et al.*, 2003). Les concentrations d'acroléine présentes dans les fluides respiratoires humains ne sont pas connues. Toutefois, plusieurs chercheurs ont émis des hypothèses. Par exemple, Cross et collègues (1995) suggèrent que les concentrations d'acroléine peuvent atteindre 80 μM dans les fluides respiratoires humains après la solubilisation complète de la fumée provenant d'une seule cigarette. Cette estimation est basée sur un modèle qui suppose que chaque cigarette contient 0,8 μmol de l'acroléine (Eiserich *et al.*, 1995). Toutefois, la concentration d'acroléine peut être plus élevée chez les fumeurs chroniques suite à son accumulation au niveau des fluides alvéolaires (Hoshino *et al.*, 2001; Berry *et al.*, 2008). Par conséquent, les concentrations employées dans notre étude (0-200 μM) sont pertinentes pour une étude de toxicité de l'acroléine qui est une composante majeure retrouvée dans la fumée de cigarette.

Pour étudier le rôle du calcium, des calpaïnes, de la caspase 12 et 4 dans la transduction du signal apoptotique induit par l'acroléine, les cellules ont été respectivement

pré-exposées durant 1 heure, au chélateur de calcium (1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid tetrakis(acetoxymethyl ester) (BAPTA-AM)) (50 μ M), à l'inhibiteur des calpaïnes (A6185) (20 μ M) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, États-Unis), de la caspase 12 (Z-Ala-Thr-Ala-Asp(OMe)-fluoromethyl ketone (Z-ATAD-FMK)) (10 μ M) ainsi que de la caspase 4 (Z-Leu-Glu(Ome)-Val-Asp(OMe)-fluoromethyl ketone (Z-LEVD-FMK)) (20 μ M) (BioVision, Mountain view, CA, États-Unis) avant d'être traitées avec l'acroléine. Nous avons choisi nos concentrations des inhibiteurs en consultant les études précédentes. Averill-Bates et collègues (2008) ont employé des concentrations de 50 μ M de BAPTA-AM, pour chélater le calcium, et de 20 μ M de l'inhibiteur A6185 pour inhiber les calpaïnes dans leur étude de l'implication des caspases dans l'apoptose induite par le tert-butylhydroperoxyde dans les hépatocytes de rat (Haidara *et al.*, 2008; Grondin *et al.*, 2007). Une concentration de 10 μ M de l'inhibiteur Z-ATAD-FMK a été utilisée par Kenney et chercheurs (2008) pour inhiber l'activité de la caspase 12 dans les cellules endothéliales humaines (Luthra *et al.*, 2008) et 20 μ M de l'inhibiteur Z-LEVD-FMK inhibe l'activité de la caspase 4 dans les cellules HeLa (Bettaieb et Averill-Bates, 2009). Les études des activités enzymatiques ont été effectuées afin de s'assurer que les concentrations d'inhibiteurs employés dans notre étude inhibent les enzymes en questions.

2.3 Étude morphologique de l'apoptose par le marquage avec le Hoechst 33258 en microscopie à fluorescence

La condensation de la chromatine est une caractéristique morphologique des cellules apoptotiques (Kroemer *et al.*, 2008) et elle est mise en évidence dans cette analyse à l'aide du Hoechst 33258 soit le 2V-[4-hydroxyphenyl]-5-[4-methyl-piperazinyl]-2,5V-bi-1H-benzimidazole (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, États-Unis). Les cellules A549 ont été incubées en présence des différentes concentrations d'acroléine variant de 0 à 200 μ M, dans le milieu α -MEM contenant 10% FBS, durant 2 et 4 heures, à 37 °C. Dans les cas indiqués, les cellules ont été pré-incubées avec le BAPTA-AM, l'inhibiteur des calpaïnes A6185, de la caspase 12 (A-ATAD-FMK) ou de la caspase 4 (Z-LEVD-FMK) durant 1 heure. L'incubation avec l'acroléine est arrêtée par une centrifugation (1000 x g, trois minutes). Les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS et ont été incubées avec 1 mg/ml de Hoechst 33258 durant 15 minutes, à 37 °C. Le Hoechst 33258 est un colorant fluorescent, perméable

aux cellules, qui émet une fluorescence verte-bleue et qui marque les noyaux en se liant aux bases adénine-thymine situées dans le petit sillon de l'ADN (Allen *et al.*, 1997; Kiechle et Zhang, 2002). Une fois l'incubation terminée, les cellules ont été de nouveau lavées deux fois avec du PBS et de l'iodure de propidium (PI) (50 µg/ml) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, États-Unis) a été ajouté pour marquer les cellules en nécrose. L'iodure de propidium est un autre colorant fluorescent, imperméable aux cellules vivantes, qui s'intercale dans l'ADN et qui émet une fluorescence rouge. Les cellules ont été ensuite observées par microscopie à fluorescence (model IM, Carl Zeiss Canada Ltd, St. Laurent, QC, Canada) et les images ainsi obtenues ont été analysées à l'aide du logiciel Northern Eclipse (Empix Imaging, Mississauga, ON, Canada). Les cellules ont été classées en trois groupes suivantes : (1) cellules viables qui sont caractérisées par une structure nucléaire organisée et une chromatine verte-bleue pâle (marquées avec Hoechst); (2) cellules apoptotiques avec une membrane intègre, caractérisées par une chromatine condensée ou fragmentée de couleur verte-bleue intense (marquées avec Hoechst); (3) les cellules nécrotiques qui ont perdue l'intégrité membranaire, caractérisée par des noyaux rouges volumineux ayant une structure normale (marquées avec PI). Pour chaque échantillon, au moins 300 cellules ont été comptées. Les pourcentages des cellules en apoptose et en nécrose ont été évalués par rapport au nombre total de cellules (Bettaieb et Averill-Bates, 2005; Haidara *et al.*, 2008; Lee et Shacter, 1997).

2.4 Détection de l'apoptose par marquage à l'annexine V-FITC en cytométrie de flux

Le début de la phase exécutive de l'apoptose est caractérisé par la redistribution et l'exposition de la phosphatidylsérine (PS) à la surface cellulaire (Blankenberg, 2008). Dans les cellules normales, il y a une distribution asymétrique des phospholipides entre les deux feuillets de la membrane plasmique. La PS est maintenue dans le feuillet interne de la membrane plasmique par l'action d'une enzyme ATP-dépendante, l'aminophospholipide translocase. Les changements biochimiques qui se produisent au cours de l'apoptose dont l'augmentation des ions de calcium dans la cellule, causent l'inactivation de la translocase et activent l'enzyme scramblase qui favorise l'externalisation de la PS. Ces modifications de la surface cellulaire sont impliquées dans la reconnaissance des cellules apoptotiques par les phagocytes (Fadok *et al.*, 1998; Schlegel et Williamson, 2007). Ainsi, il est possible de

marquer les cellules apoptotiques avec l'annexine V, couplé à un fluorochrome fluorescéine isothiocyanate (FITC) (fluorescence verte) qui a une grande affinité pour la PS (Blankenberg, 2008).

La détection de la mort cellulaire à l'aide du marquage à l'annexine V-FITC a été effectuée selon le protocole de van Engeland et collaborateurs (1998). Les cellules A549 (1×10^6) ont été exposées à l'acroléine (0-200 μM) durant 2 heures dans le milieu α -MEM contenant 10% FBS. Ensuite, les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS et resuspendues dans 1 ml de tampon 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)/NaOH à 100 mM à pH 7,4 contenant 140 mM de NaCl et 2,5 mM de CaCl_2 . Un volume de 100 μl de la suspension cellulaire a été ensuite incubé avec 5 μl d'annexine V-FITC (BD Biosciences Canada, Mississauga, ON, Canada) et du PI (0,01 mg/ml) durant 15 minutes à la température de la pièce et à l'obscurité. La suspension cellulaire a été ensuite diluée pour obtenir un volume final de 500 μl et 10 000 cellules ont été analysées à l'aide d'un cytomètre de flux (FACScan® Plus, Becton Dickinson, San José, États-Unis) équipé d'une source d'excitation, composée d'un laser argon (100 mW) RPC (ILT, Salt Lake City, États-Unis), refroidi à l'air, émettant à 488 nm. Quatre paramètres ont été analysés simultanément : 2 fluorescences recueillies à 90° (annexine V-FITC (FL1) et PI (FL3)) et 2 diffusions de lumière (petits et grands angles). Pour l'analyse de la fluorescence verte (annexine V-FITC), un filtre "long pass" de 515 nm et un filtre "short pass" de 560 nm ont été utilisés. Pour l'analyse de la fluorescence rouge (PI) un filtre "long pass" de 610 nm a été employé. La mesure de la diffusion de la lumière aux petits angles (Forward Scatter) et aux grands angles (Side Scatter), définissant des critères de taille et de granulométrie des particules, a permis de reconnaître et d'éliminer les débris. Pour chaque échantillon, quatre populations de cellules ont été distinguées : (1) cellules vivantes situées dans le quadrant inférieur gauche (annexine V⁻/PI⁻) ; (2) cellules en apoptose au stade précoce situées dans le quadrant inférieur droit (annexine V⁺/PI⁻) ; (3) cellules apoptotiques au stade tardif situées dans le quadrant supérieur droit (annexine V⁺/PI⁺) ; (4) cellules nécrotiques situées dans le quadrant supérieur gauche (annexine V⁻/PI⁺). L'analyse des données a été effectuée avec le logiciel Cell Quest (BD Biosciences, San Jose, CA, États-Unis). Les pourcentages associés

aux cellules apoptotiques regroupent les populations de cellules en apoptose précoce et tardive.

2.5 Étude de l'activité enzymatique des caspases et des calpaïnes par fluorimétrie

L'activité des enzymes a été suivie grâce à la fluorescence émise par un fluorochrome qui est libéré suite au clivage des substrats peptidiques par chaque enzyme. L'intensité de cette fluorescence, qui a été quantifiée par un spectromètre à fluorescence, est proportionnelle à l'activité des enzymes. Les cellules A549 (1×10^6) ont été incubées en présence des différentes concentrations d'acroléine (0 à 200 μM), dans le milieu α -MEM contenant 10% FBS, durant 2 heures, à 37 °C. Dans les cas indiqués, les cellules ont été pré-incubées avec le BAPTA-AM ou l'inhibiteur des calpaïnes durant 1 heure. Une fois l'incubation terminée, les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS et resuspendues dans 75 μl de tampon de réaction contenant 20 mM de *piperazine-N-N-bis-(2-ethanesulfonic acid)* (PIPES), 100 mM de NaCl, 10 mM de dithiothréitol (DTT), 1 mM de *ethylene diamine tetraacetic acid* (EDTA), 0.1% de *3-(3-cholamidopropyl-dimethylammonio)-2-hydroxy-1-propane sulfonic acid* (CHAPS) et 10% de sucrose à pH 7.2. Les cellules ont été lysées à -80 °C durant 30 minutes et les lysats ont été incubés, à 37 °C, en présence de 25 μl des substrats de chaque enzyme (50 μM). L'activité des calpaïnes et des caspases 3, 7, 12 et 4 a été respectivement mesurée par le clivage des substrats Suc-LY-7-amino-4-méthylcoumarin (Suc-LY-AMC), Acétyl (Ac)-DEVD-AMC, ((7-méthoxycoumarin-4-yl)acétyl (MCA))-VDQVDGWK(2,4-dinitrophényl (DNP))-NH₂, ATAD-7-amino-4-trifluorométhylcoumarin (ATAD-AFC) et Ac-LEVD-AFC (Calbiochem, La Jolla, CA, États-Unis). La libération des fluorochromes AMC et AFC ont été mesurées, durant 30 minutes, à l'aide d'un spectrofluorimètre Spectra Max Gemini (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, États-Unis) avec une longueur d'onde d'excitation ($\lambda_{\text{excitation}}$) de 400 nm et une longueur d'onde d'émission ($\lambda_{\text{émission}}$) de 505 nm dans le cas d'AMC et une $\lambda_{\text{excitation}}$ de 380 nm et une $\lambda_{\text{émission}}$ de 460 nm dans le cas d'AFC. Dans le cas de la caspase 7, une $\lambda_{\text{excitation}}$ de 325 nm et une $\lambda_{\text{émission}}$ de 395 nm ont été employées (Bettaieb et Averill-Bates, 2005; Hampton et Orrenius, 1997; Stennicke et Salvesen, 1997). Les activités des enzymes ont été représentées par des unités cumulatives relatives de fluorescence qui ont été normalisées par rapport au contrôle (cellules non traitées).

Le substrat Suc-LY-AMC est clivé par les μ et m-calpaïnes avec des constantes de Michaelis (K_m) respectivement de 4,74 et 2,21 mM (Sasaki *et al.*, 1984). Ce substrat peut également être hydrolysé par l'enzyme végétale papaine et par la protéase Ti d'*Escherichia coli* (Sasaki *et al.*, 1984 et Woo *et al.*, 1989). En ce qui concerne les caspases, ces enzymes reconnaissent quatre acides aminés consécutifs (P4-P3-P2-P1) au niveau de leurs substrats et hydrolysent la liaison peptidique du côté C-terminal du résidu P1 qui est généralement un résidu D. La nature des autres acides aminés du térapeptide définit la spécificité des différentes caspases (Nicholson, 1999). Ainsi, le térapeptide DEVD peut être hydrolysé par la caspase 3, 7, 1, 6 et 4. Toutefois, la séquence DEVD est plus sélective à la caspase 3 comparé aux autres caspases. Voici les rapports de nombre de turnover (k_{cat})/ K_m pour l'hydrolyse du substrat Ac-DEVD-p-nitroanilide (pNA) : 218000 s^{-1} pour la caspase 3, 37000 s^{-1} pour la caspase 7, 30000 s^{-1} pour la caspase 1, 2000 s^{-1} pour la caspase 6 et 1800 s^{-1} pour la caspase 4. Notons que le rapport k_{cat}/K_m est une mesure de la spécificité et de l'efficacité de l'enzyme (Talanian *et al.*, 1997). Pour l'étude de l'activité de la caspase 7, le peptide MCA-VDQVDGWK(DNP)-NH₂ a été utilisé. Ce peptide est hydrolysé par la caspase 7 avec une K_m de 125 μ M. Le clivage de ce peptide par d'autres protéases n'a pas été étudié. La séquence ATAD présente dans le substrat de caspase 12 correspond à la séquence située entre la grande et la petite sous-unité de la procaspase 12. Roy et collaborateurs (2008) ont montré que l'hydrolyse du substrat ATAD-AMC par la caspase 12 est caractérisée par une activité spécifique de 65,2 unités arbitraires de fluorescence·min⁻¹·mg⁻¹ (Roy *et al.*, 2008). L'étude de l'hydrolyse de l'ATAD-AFC par d'autres caspases n'a pas été rapportée dans la littérature. En ce qui concerne la caspase 4, parmi les différentes combinaisons térapeptidiques, c'est la séquence LEVD qui présente la plus grande affinité avec un k_{cat}/K_m de 3200 s^{-1} . Cependant, ce peptide est également reconnu par les caspases 1 et 6 (Talanian *et al.*, 1997).

2.6 Étude de l'expression totale des protéines par immunobuvardage

Après une exposition à l'acroléine (0-200 μ M) durant 30 minutes et 2 heures à 37 °C, les cellules A549 (10×10^6) ont été lavées avec du tampon A contenant 100 mM de sucrose, 1 mM de *ethylene glycol tetraacetic acid* (EGTA), 20 mM de 3-(*N-morpholino*)-propane sulfonic acid (MOPS) à pH 7,4 (Samali *et al.*, 1999) et lysées dans 500 μ l de tampon de lyse (modifié légèrement de Guay *et al.*, 1997) contenant 20 mM de Tris-HCl à pH 7,4, 150 mM

de NaCl, 10% de glycérol, 80 mM de β -glycérophosphate, 10 mM d'EGTA, 0,5 mM d'EDTA, 1 mM de Na_3VO_4 , 5 mM de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 50 mM de NaF, 2% de sodium dodécyl sulfate (SDS), 1% de Triton X-100, 1 mM de DTT et 1% de cocktail d'inhibiteurs de protéases durant 1 heure, à 4   C, en vortexant à chaque 15 minutes. Les débris et les cellules non lysées ont été éliminés par une centrifugation de 10 minutes à 14 000g, à 4   C (Guay *et al.*, 1997) et les concentrations des protéines contenues dans les surnageants ont été mesur  es par la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Les protéines (30 μg) ont été solubilis  es dans du tampon d'échantillon (Laemmli, 1970), incubées à 100   C durant 5 minutes et d  pos  es sur un gel de polyacrylamide (10-15%) en présence de SDS. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS a été effectu  e selon la méthode de Laemmli (Laemmli, 1970). La migration des protéines a été effectu  e dans du tampon de migration, contenant 25 mM de Tris base, 192 mM de glycine et 0,1% (p/v) de SDS, avec un voltage constant de 125V durant 90 minutes. Les protéines ainsi s  par  es ont été transf  r  es sur une membrane de *polyvinylidene difluoride* (PVDF) préalablement sensibilis  e avec du méthanol. Le transfert de type humide a été effectué dans du tampon de transfert contenant 25 mM de Tris base, 192 mM de glycine et 20% (v/v) de méthanol durant 1 heure à 100V. Les membranes ont été bloqu  es avec du tampon Tris salin (contenant 50 mM de Tris et 150 mM de NaCl) contenant 0,1% de Tween 20 (TBS-T) et 5% de lait écrémé durant 1 heure à la température de la pièce. Après le blocage, les membranes ont été lavées avec du TBS-T, quatre fois (15 minutes), avant d'être expos  es aux anticorps primaires contenus dans le TBS-T contenant 1% d'albumine sérique bovine (BSA) durant toute la nuit à 4   C : anti-ICAD (1 : 1000), anti-PERK (1 : 5000), anti-pPERK (1 : 5000), anti-ATF6 α (1 : 5000), anti-IRE1 α (1 : 5000), anti-CHOP (1 : 1000), anti-calpastatine (1 : 10 000), anti-calpaïne-1 (1 : 1000), anti-procaspase 12 (1 : 1000), anti-glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) (1 : 10 000) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, Etats-Unis), anti-Bip (1 : 10 000) (BD Biosciences Canada, Mississauga, ON, Canada) et anti-pIRE1 α (1 : 5000) (Stressgen, San Diego, CA,   tats-Unis). L'excès des anticorps primaires a été éliminé par quatre lavages (15 minutes) avec du TBS-T et les membranes ont été ensuite incubées durant 1 heure avec une solution de TBS-T, contenant 5% de lait écrémé et les anticorps secondaires appropriés conjugués à la peroxydase de raifort (HRP) (1 : 1000) : anti-IgG de lapin et anti-IgG de souris (Biosource, Camarillo, CA,   tats-Unis). L'excès des anticorps secondaires a été éliminé par quatre

lavages (15 minutes) avec du TBS-T. La détection des protéines a été effectuée par chimioluminescence à l'aide du kit ECL Plus (PerkinElmer, Boston, MA, États-Unis) et des films de haute performance (Fuji medical X-ray film, Düsseldorf, Allemagne). L'analyse des bandes a été réalisée à l'aide d'un densitomètre équipé d'un logiciel IP Lab gel (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, États-Unis). Les valeurs ont été normalisées avec les densités de GAPDH et ont été exprimées par rapport au contrôle (cellules non traitées).

2.7 Détection du Ca^{2+} libre cytosolique par marquage au fluo-3 en cytométrie de flux

La mesure du taux de calcium libre intracellulaire a été effectuée à l'aide de la sonde fluorescente fluo-3-acétoxyméthyl ester (fluo-3-AM) (Invitrogen, Carlsbad, CA, États-Unis) qui est un chélateur de calcium. La sonde fluo-3-AM est caractérisée par une autofluorescence faible (en absence de calcium) et lorsque liée au Ca^{2+} libre, elle émet de la fluorescence verte ($\lambda_{\text{max}} = 526 \text{ nm}$). La sonde fluo-3-AM est perméable à toutes les membranes cellulaires mais elle n'a pas d'affinité pour le calcium. Une fois dans les cellules, le groupement AM de fluo-3-AM est hydrolysé par les estérases cellulaires et la sonde devient chargée et a une grande affinité pour le calcium ionisé. Ainsi, la fluorescence de fluo-3 est directement proportionnelle à la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (intracellulaire) (Burchiel *et al.*, 2000; Wheatly *et al.*, 2001). Les cellules A549 (1×10^6) ont été incubées, en présence des différentes concentrations d'acroléine (0-200 μM), durant 2 heures, à 37 °C, dans le milieu α -MEM contenant 10% de FBS. L'arrêt de l'incubation a été effectué par un lavage des cellules avec du milieu α -MEM sans sérum. Ensuite, les cellules ont été resuspendues dans le milieu α -MEM sans sérum et exposées à la sonde fluorescente fluo-3-AM (4 μM) durant 45 minutes à l'obscurité, à 37 °C. Les échantillons ont été conservés à l'obscurité à 37 °C jusqu'à l'analyse. Le niveau de calcium libre ou l'intensité de fluorescence de fluo-3 ont été mesurés par un cytomètre de flux, équipé d'un laser argon émettant à 488 nm, à l'aide du détecteur FL-1 (530 nm). Pour chaque échantillon, la fluorescence moyenne des 10 000 cellules a été analysée avec le logiciel Cell Quest (BD Biosciences, San Jose, CA, États-Unis) et les valeurs ont été exprimées par rapport aux cellules contrôle non traitées avec l'acroléine (Foller *et al.*, 2008).

2.8 Analyses statistiques

Les expériences ont été effectuées plusieurs fois (un minimum de trois cultures différentes). Les résultats ont été présentés avec moyennes et les écarts-moyens. Lorsque le nombre d'observations était de trois, les résultats ont été présentés avec les moyennes et les écarts types. Les statistiques ont été analysées en utilisant le programme SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, Etats-Unis). Lorsque le nombre d'observations a été élevé, l'analyse de variance a été effectuée (ANOVA) avec le test de Tukey. Ce test compare toutes les paires de moyennes et montre des différences avec un risque $\alpha = 0,05$. Cette analyse a été effectuée pour les tests de Hoechst 33258, l'étude de l'expression des protéines PERK, pPERK, IRE1 α , pIRE1 α et calpastatine. Dans le cas de l'analyse de l'apoptose par marquage à l'annexine V, l'étude des activités enzymatiques des caspases 3, 7, 12 et 4 ainsi que des calpaïnes, l'étude de l'expression des protéines ICAD, ATF6 α , Bip, CHOP et de la calpaïne ainsi que la mesure du calcium libre par cytométrie de flux, le test de Student a été utilisé pour déterminer si les valeurs des différents groupes étaient significativement différentes. Une valeur de $P < 0,05$ (*) a été reconnue comme indiquant une différence significative lorsque comparé avec les cellules contrôle (0 μ M) et $P < 0,05$ (#) lorsque comparé avec les cellules non pré-incubées avec BAPTA-AM, A6185, Z-ATAD-FMK ou Z-LEVD-FMK pour les mêmes concentrations d'acroléine.

CHAPITRE III RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

3.1 Préface

Ce chapitre regroupe les résultats obtenus dans le cadre de mon programme de maîtrise en chimie (concentration en biochimie). J'ai effectué la plupart de ces expériences moi-même mais j'ai aussi reçu de l'aide de mes collègues Ahmed Bettaieb et Pragathi Pallepati. Plus précisément, pour la figure 3.4 B, Pragathi Pallepati a effectué l'immunobuvardage sur les lysats de cellules préparés par moi. Les résultats présentés dans la figure 3.1 B et D ont été obtenus par Ahmed Bettaieb. De plus, pour les expériences présentées dans la figure 3.8, le traitement des cellules a été réalisé par Ahmed Bettaieb et j'ai effectué le test de Hoechst 33258.

3.2 Résultats

3.2.1 L'acroléine induit l'apoptose dans les pneumocytes A549.

Au cours de l'apoptose, les cellules subissent plusieurs changements morphologiques et biochimiques dont la condensation de la chromatine ainsi que le changement de la structure membranaire. Ces caractéristiques apoptotiques résultent en partie de l'activation des caspases (Saraste et Pulkki, 2000; Tait, 2008). Afin d'évaluer le potentiel de l'acroléine à induire une réponse de type apoptotique, les pneumocytes A549 ont été exposés à différentes concentrations de cette substance toxique (0-200 μ M) durant 2 ou 4 heures et les différentes caractéristiques de l'apoptose ont été ensuite mesurées.

Tout d'abord, l'étude de la condensation de la chromatine a été réalisée par microscopie à fluorescence à l'aide d'un marquage au Hoechst 33258 et au PI. Les cellules normales, marquées avec le Hoechst 33258, sont caractérisées par une fluorescence bleu-verte pâle, tandis que la chromatine des cellules apoptotiques est condensée et donc l'intensité de la fluorescence des noyaux marqués par le Hoechst 33258 est accrue. Les cellules nécrotiques, quant à elles, ont incorporé le PI et sont caractérisées par une

fluorescence rouge. Il est important de noter que les cellules au stade tardif de l'apoptose perdent leur intégrité membranaire et incorpore également le PI. Ces cellules sont caractérisées par une coloration rouge. La figure 3.1 (A-D) indique que l'acroléine induit la condensation de la chromatine des cellules A549. En effet, une exposition de 2 heures à l'acroléine (25-200 μM) résulte en une augmentation du pourcentage des cellules apoptotiques (coloration bleue-verte intense) qui varie entre 20 et 27% comparativement à 7% retrouvé dans le témoin. Dans ce cas, l'induction de la réponse apoptotique ne semble pas être concentration dépendante (figure 3.1C). Des taux d'apoptose plus importants ont été observés après un traitement de 4 heures avec l'acroléine (25-200 μM) qui varient, dépendamment de la concentration du toxique, entre 17 et 48% comparativement à 4% en situation contrôle (figure 3.1D). En ce qui concerne la nécrose, l'induction de ce type de mort cellulaire par l'acroléine, dans les cellules A549, est faible (moins de 12%) mise à part l'exposition de 4 heures à 200 μM d'acroléine qui augmente le nombre de cellules nécrotiques à 18% par rapport aux cellules non traitées avec l'acroléine (figure 3.1C-D). Nous avons observé un taux d'apoptose plus important dans les cellules A549 exposées 4 heures à l'acroléine. Toutefois, étant donné que nous nous intéressons aux mécanismes d'induction de l'apoptose, qui sont plus susceptibles d'être déclenchés plus tôt dans la cascade apoptotique, nous avons choisi un traitement de 2 heures pour nos études subséquentes.

Ensuite, pour confirmer nos résultats, nous avons étudié l'externalisation de la PS à l'aide de la cytométrie de flux suite à un marquage à l'annexine V-FITC. L'externalisation de la PS, qui est normalement présente dans le feuillet interne de la membrane plasmique, s'effectue vers le début de la phase d'exécution de l'apoptose (Martin *et al.*, 1996). L'annexine V se fixe sur ce phospholipide anionique et permet ainsi de quantifier les cellules apoptotiques (positives à l'annexine V). Sur la figure 3.2 (A-D), il est possible de remarquer que l'acroléine (100-200 μM) induit, après 2 heures, l'externalisation de la PS dans les cellules pulmonaires A549. Les concentrations de 50 et de 75 μM d'acroléine ont seulement affectées légèrement l'externalisation de la PS alors que 100 et 200 μM d'acroléine ont eu un effet significatif sur l'externalisation de la PS. En effet, cette substance toxique cause une augmentation du taux des cellules apoptotiques (annexine V positives) qui passe de 12%

(contrôle) à respectivement 19, 23, 28 et 37% dans le cas de 50, 75, 100 et 200 μM d'acroléine. Les pourcentages des cellules nécrotiques (PI positives) quant à eux, ne sont pas affectés par l'acroléine et restent inférieurs à 4%. Contrairement aux résultats obtenus avec le test de Hoechst 33258, l'analyse par cytométrie de flux indique que 25 μM d'acroléine ne déclenche aucune réponse apoptotique dans les pneumocytes A549. De plus, les pourcentages d'apoptose, obtenus par marquage avec l'annexine V, sont plus importants que ceux obtenus par marquage avec le Hoechst 33258 (200 μM : 37% avec l'annexine V comparativement à 24% avec le Hoechst 33258). Il est important de noter que l'externalisation de la PS est un événement qui s'effectue au début de la phase d'exécution de l'apoptose alors que la condensation de la chromatine est observée à la fin de la phase d'exécution de ce type de mort cellulaire. Par ailleurs, l'analyse de l'apoptose par le marquage annexine V dépend du type cellulaire. En effet, il est connu que la P-glycoprotéine peut jouer le rôle d'une enzyme flippase et ainsi favoriser l'externalisation de la PS. Ceci peut affecter l'étude de l'apoptose dans les cellules qui surexpriment la P-glycoprotéine dont les cellules A549 (Wrzal *et al.*, 2008; Pohl *et al.*, 2002; Romsicki et Sharom, 2001). Ainsi, ces différences observées sont probablement attribuées à la nature différente des critères étudiés d'où l'importance de confirmer les résultats par différentes méthodes. Parmi les méthodes disponibles pour étudier l'apoptose citons la détection du clivage enzymatique de l'ADN nucléaire à l'aide de l'électrophorèse en gel d'agarose ou à l'aide de la cytométrie de flux avec la technique *Tdt-mediated-dUTP nick end-labeling* (TUNEL), l'étude des activités des caspases par la fluorimétrie, la cytométrie de flux ou l'immunobuvardage ainsi que l'étude de l'expression des protéines régulatrices de l'apoptose à l'aide de la cytométrie de flux ou de l'immunobuvardage (Elmore, 2007).

En ce qui concerne les différences obtenues avec les deux méthodes entre les pourcentages des cellules nécrotiques, elles peuvent être expliquées par le fait que dans l'analyse par cytométrie de flux (annexine V) nous avons considéré les cellules annexine V et PI positives comme des cellules apoptotiques. Cependant en microscopie à fluorescence les cellules qui ont incorporé le PI sont caractérisées par une couleur orange-rouge et donc considéré comme nécrotiques. Cela peut expliquer l'écart des pourcentages de nécrose

observé. Il est important de souligner le fait que les deux méthodes ont détecté de faibles taux de cellules nécrotiques.

Dans notre étude, afin de s'assurer que la mort cellulaire provoquée par l'acroléine est de nature apoptotique, l'activation des caspases effectrices 3 et 7 a été étudiée par fluorimétrie à l'aide des substrats synthétiques fluorescents. Les résultats ainsi obtenus (figure 3.3 (A et B)) mettent en évidence l'activité de la caspase 3 et 7 dans les cellules pulmonaires A549 après un traitement de 2 heures à l'acroléine (25-200 μ M). Plus précisément, l'acroléine n'a pas d'effet significatif sur l'activité de la caspase 3 qui augmente de 20 à 60% par rapport aux cellules non traitées à l'acroléine. Toutefois, l'acroléine induit une augmentation significative de l'activité de la caspase 7 qui est de 2,7 à 3,4 fois plus active dans les cellules traitées avec l'acroléine que dans les cellules témoin.

L'activation des caspases effectrices de l'apoptose aboutit à la dégradation spécifique de plusieurs substrats qui sont impliqués dans la propagation et l'exécution de l'apoptose. Entre autres, ces protéases effectrices de l'apoptose sont responsables de l'activation des endonucléases. En effet, les caspases 3 et 7 clivent l'ICAD ce qui libère l'ADNase CAD qui est transloquée au niveau du noyau où elle participe à la fragmentation internucléosomique de l'ADN. Ainsi, l'activation de la caspase 7 a été confirmée en analysant, par immunobuvardage, le clivage de son substrat physiologique ICAD. Les résultats présentés dans la figure 3.3 (C) indiquent que l'expression d'ICAD diminue suite à un traitement de 2 heures avec 75-200 μ M d'acroléine dans les cellules A549. Dans l'ensemble, les données présentées dans cette partie permettent d'affirmer que la mort cellulaire, induite par l'acroléine dans les cellules cancéreuses A549, est un processus apoptotique. L'étape suivante est d'étudier l'implication du RE dans l'apoptose induite par l'acroléine.

3.2.2 L'acroléine induit la signalisation UPR dans les cellules A549.

Étant donné que l'acroléine perturbe l'environnement adéquat au repliement protéique, il est possible que cette substance toxique cause un stress du RE et déclenche ainsi la réponse UPR. La signalisation UPR est une réponse adaptative qui tente de rétablir

l'homéostasie du RE. Cependant, lorsque le stress est trop intense ou de longue durée l'apoptose par la voie du RE est déclenchée (Faitova *et al.*, 2006). Dans notre étude nous nous sommes concentrés sur la transduction du signal apoptotique qui implique le RE par conséquent nous avons vérifié si l'acroléine cause un stress du RE en déclenchant la réponse UPR et si le stress causé par l'acroléine est assez rigoureux pour induire l'apoptose par la voie du RE.

Le déclenchement de la réponse UPR est médié par trois molécules transmembranaires du RE : PERK, ATF6 et IRE1. L'activation de ces trois protéines sensibles au stress du RE, par l'acroléine, a été mise en évidence par immunodétection de leurs formes actives (PERK et IRE1 α) ou de la forme clivée d'ATF6 α (figure 3.4). L'activation de PERK s'effectue via son oligomérisation suivie de son autophosphorylation. L'expression de la kinase PERK phosphorylée (pPERK) augmente de 60% dans les cellules exposées à 50 μ M d'acroléine durant 2 heures par rapport aux cellules contrôle (figure 3.4A). À 200 μ M d'acroléine, le taux de pPERK revient au niveau de base. Il est important de noter que le niveau d'expression totale de PERK reste stable dans ces conditions de traitement.

Dans le cas de l'ATF6 α , son activation se traduit par son clivage suivie de sa relocalisation au niveau du noyau où il active la transcription des gènes cibles. La figure 3.4B illustre ce clivage induit par l'acroléine, après 2 heures d'exposition, dans les cellules A549. Plus précisément, l'expression de la forme non active de l'ATF6 α diminue de 13 à 59% dans les pneumocytes traités 2 heures avec l'acroléine (50-200 μ M) par rapport aux pneumocytes contrôles.

L'acroléine (25-75 μ M) provoque également une augmentation de l'expression de la forme active phosphorylée d'IRE1 α qui augmente de 1 à 1,9 fois dans les cellules traitées pendant 2 heures comparativement aux cellules contrôles (figure 3.4C). Comme dans le cas de PERK, le niveau de phosphorylation d'IRE1 α revient au niveau de base à 200 μ M d'acroléine. L'expression totale d'IRE1 α reste stable dans ces conditions de traitement. De tels résultats suggèrent que l'acroléine cause probablement un stress du RE qui se traduit par l'activation des trois branches de la réponse UPR.

L'activation des trois branches de la réponse UPR aboutit à l'augmentation de l'expression de plusieurs gènes qui favorisent le repliement des protéines et la dégradation des protéines à conformation anormale dans le but de rétablir l'homéostasie du RE. Dans ce cas, Bip est une des protéines chaperonnes qui sont induites dans les conditions de stress du RE. Nous avons d'abord étudié l'expression de cette protéine dans les cellules A549 exposées pendant 2 heures aux différentes concentrations d'acroléine (25-200 μM). La figure 3.4D indique que dans ce cas, il n'y a pas d'induction de la protéine Bip par l'acroléine. Nous avons alors vérifié l'induction de la protéine Bip dans les cellules A549 traitées 30 minutes et 1 heure (résultats non montré) avec l'acroléine. L'induction de Bip n'a pas été observée après un traitement de 1 heure et seulement une faible induction (non significative) a été observée après 30 minutes d'exposition à l'acroléine (25-100 μM). Ainsi, un traitement de 2 heures à l'acroléine active les trois voies de la réponse UPR dans les pneumocytes A549 sans induire l'expression de Bip. Nous avons continué notre étude en évaluant l'implication du RE dans l'induction de l'apoptose induite par l'acroléine dans les cellules pulmonaires A549.

3.2.3 L'implication de la voie du RE dans la transduction du signal apoptotique dans les cellules A549.

Un stress rigoureux ou prolongé du RE peut aboutir à l'apoptose par plusieurs voies dont celle qui implique l'induction de l'expression de CHOP. L'étude de l'expression de ce facteur de transcription par immunobuvardage dans les pneumocytes A549 montre que l'acroléine (100 μM) induit d'environ 2 fois son expression (figure 3.4E). CHOP atténue l'expression des protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 ce qui favorise l'apoptose.

Un autre facteur qui est impliqué dans l'apoptose induite par la voie du RE est le calcium. Son homéostasie est perturbée durant le stress du RE qui se traduit par une augmentation de sa concentration libre intracellulaire suite à sa libération à partir du RE. Ce flux du calcium a été mis en évidence par cytométrie en flux à l'aide de la sonde fluo-3-AM. La figure 3.5 (A-B) montre que l'acroléine (75-200 μM) cause une augmentation de la concentration du calcium libre intracellulaire après 2 heures d'exposition dans les cellules A549. Il est important de constater que pour les faibles concentrations d'acroléine (25-50 μM)

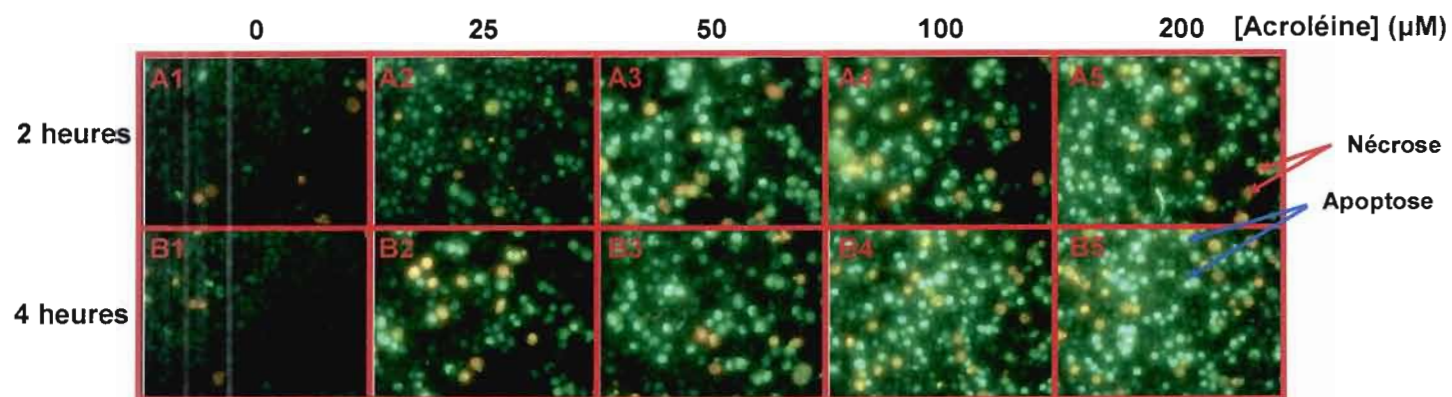
le flux calcique n'a pas été détecté. Une fois dans le cytosol, le calcium joue son rôle pro-apoptotique en activant les protéases calcium dépendantes, les calpaïnes.

Dans les cellules normales, les calpaïnes sont maintenues sous leur forme inactive via leur association avec leur inhibiteur protéique la calpastatine. Durant l'apoptose, la calpastatine est clivée par les caspases ce qui libère les calpaïnes permettant ainsi leur activation. La figure 3.6A montre que l'acroléine (25-200 μM) induit le clivage de la calpastatine. Ce clivage de la calpastatine résulte en l'activation des calpaïnes tel que montré à la figure 3.6C. En effet, la figure 3.6C indique qu'une exposition de 2 heures à 25-200 μM d'acroléine augmente d'environ 50% l'activité des calpaïnes par rapport aux cellules contrôles. Il est important de noter que cette activité est dépendante du calcium puisque le chélateur BAPTA-AM inhibe l'activité des calpaïnes. Cette activité est également inhibée par l'inhibiteur des calpaïnes (voir figure 3.6C). Certaines études suggèrent que l'activation des calpaïnes implique une autolyse de leur sous-unité catalytique ce qui favorise leur translocation au niveau d'une membrane lipidique (Suzuki *et al.*, 2004). Toutefois, dans certains modèles cellulaires, l'activation de calpaïnes n'implique pas nécessairement leur autolyse (Grondin *et al.*, 2007). Nous avons étudié le clivage de la sous-unité catalytique de calpaïne dans nos cellules. La figure 3.6B indique qu'après un traitement de 2 heures, 75 et 100 μM d'acroléine induisent un faible clivage (non significatif) de la sous unité catalytique de calpaïne et un clivage plus important est observé à 200 μM de l'acroléine. Ces résultats suggèrent que dans notre modèle cellulaire les calpaïnes peuvent être activées sans être clivées. Il sera intéressant d'étudier une translocation des calpaïnes au niveau des fractions microsomales. Une fois actives, les calpaïnes propagent le signal apoptotique en clivant plusieurs substrats dont la caspase 12 qui est associée à la membrane du RE.

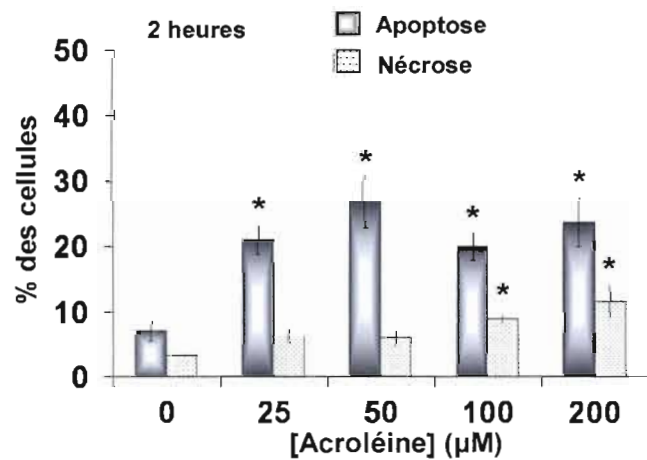
La présence de la caspase 12 active dans les cellules humaines reste encore un sujet controversé. Plusieurs études suggèrent que la caspase 4 remplace la caspase 12 des rongeurs chez les humains. Nous avons étudié l'activité de ces deux caspases dans les cellules humaines A549 traitées ou non avec l'acroléine durant 2 heures. Par immunobuvardage, nous avons détecté la procaspase 12 dont l'expression diminue de 27 à 67% suite à une exposition de 2 heures à l'acroléine (25-200 μM) (figure 3.7A). Nous avons également tenté de détecter

le clivage de la caspase 4 par immunobuvardage. Toutefois, nous n'avons pas réussi de détecter cette enzyme. D'autres expériences sont nécessaires pour la mise au point de ce protocole. Le clivage de la procaspase 12 résulte en son activation telle qu'illustré dans la figure 3.7B par les tests de fluorimétrie. Ainsi, un traitement de 2 heures à l'acroléine (25-100 μ M) induit une augmentation de 28 à 51% de l'activité de la caspase 12 dans les cellules A549. Dans le cas de la caspase 4, une augmentation significative d'environ 50% de l'activité de cette enzyme a été observée seulement à 25 et 50 μ M de l'acroléine. Plusieurs mécanismes sont responsables de l'activation de ces caspases initiateurs de l'apoptose. Nous avons approfondi l'implication du calcium et des calpaïnes dans l'activation de ces caspases. La figure 3.7 (B et C) montre que l'activation des caspases 12 et 4 est prévenue par le chélateur BAPTA-AM ainsi que par l'inhibiteur des calpaïnes suggérant ainsi que le calcium et les calpaïnes jouent un rôle dans l'activation des caspases 12 et 4 par l'acroléine.

Afin de confirmer l'implication de la voie du RE dans la transduction du signal apoptotique dans les cellules A549 exposées à l'acroléine, nous avons pré-exposé ces dernières au chélateur du calcium BAPTA-AM ainsi qu'aux inhibiteurs des calpaïnes, de la caspase 12 et 4. Par la suite, l'apoptose a été étudiée par microscopie à fluorescence suite au marquage au Hoechst 33258. Pour cette étude, nous avons employé des concentrations d'acroléine auxquelles nous avons détecté l'activité des calpaïnes ainsi que des caspases 12 et 4 soit 25 et 50 μ M d'acroléine. En observant la figure 3.8, il est possible de constater que la chélation du calcium (25-50 μ M) ainsi que l'inhibition des calpaïnes (50 μ M) inhibent l'apoptose induite par l'acroléine dans les cellules pulmonaires A549. Toutefois, l'inhibition des caspase 12 et 4 ne semble pas affecter de façon significative ce type de mort cellulaire induit par l'acroléine. Dans le cas de la caspase 4, il y a une inhibition partielle mais non significative de l'apoptose induite par 25 μ M d'acroléine (voir figure 3.8F). L'induction de la nécrose n'a pas été affectée par aucun des inhibiteurs employés. De plus, les traitements des cellules A549 avec le chélateur de calcium BAPTA-AM ainsi qu'avec les inhibiteurs de calpaïnes et des caspases 12 et 4 sans acroléine n'ont pas induit une mortalité significative (figure 3.8G). En conclusion, le processus apoptotique induit par l'acroléine peut être médié par la voie du RE via l'induction de CHOP, l'augmentation du flux calcique et l'activation des calpaïnes mais n'implique pas nécessairement l'activation des caspases 12 et 4.



C



D

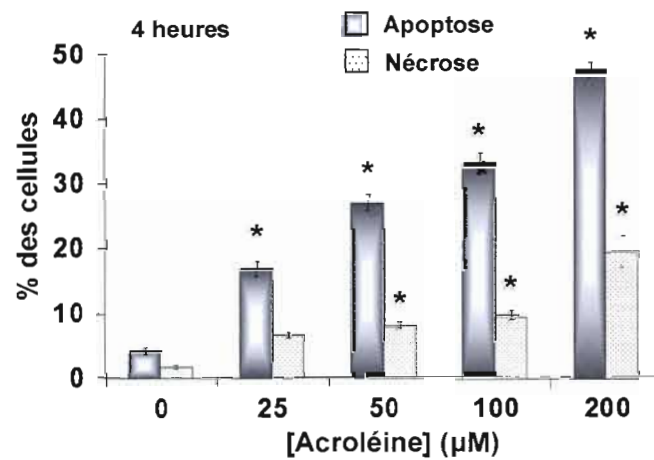


Figure 3.1A-D

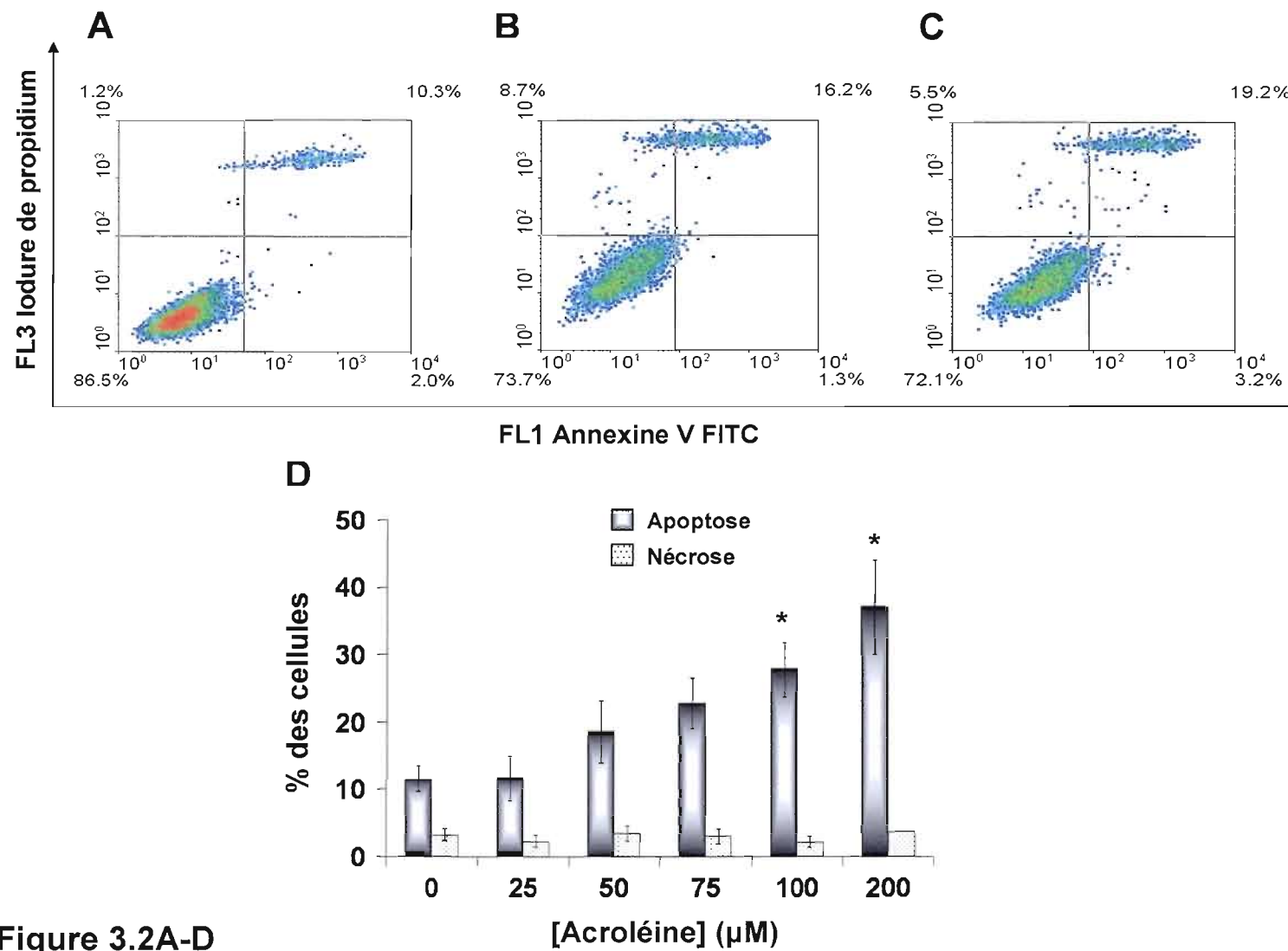


Figure 3.2A-D

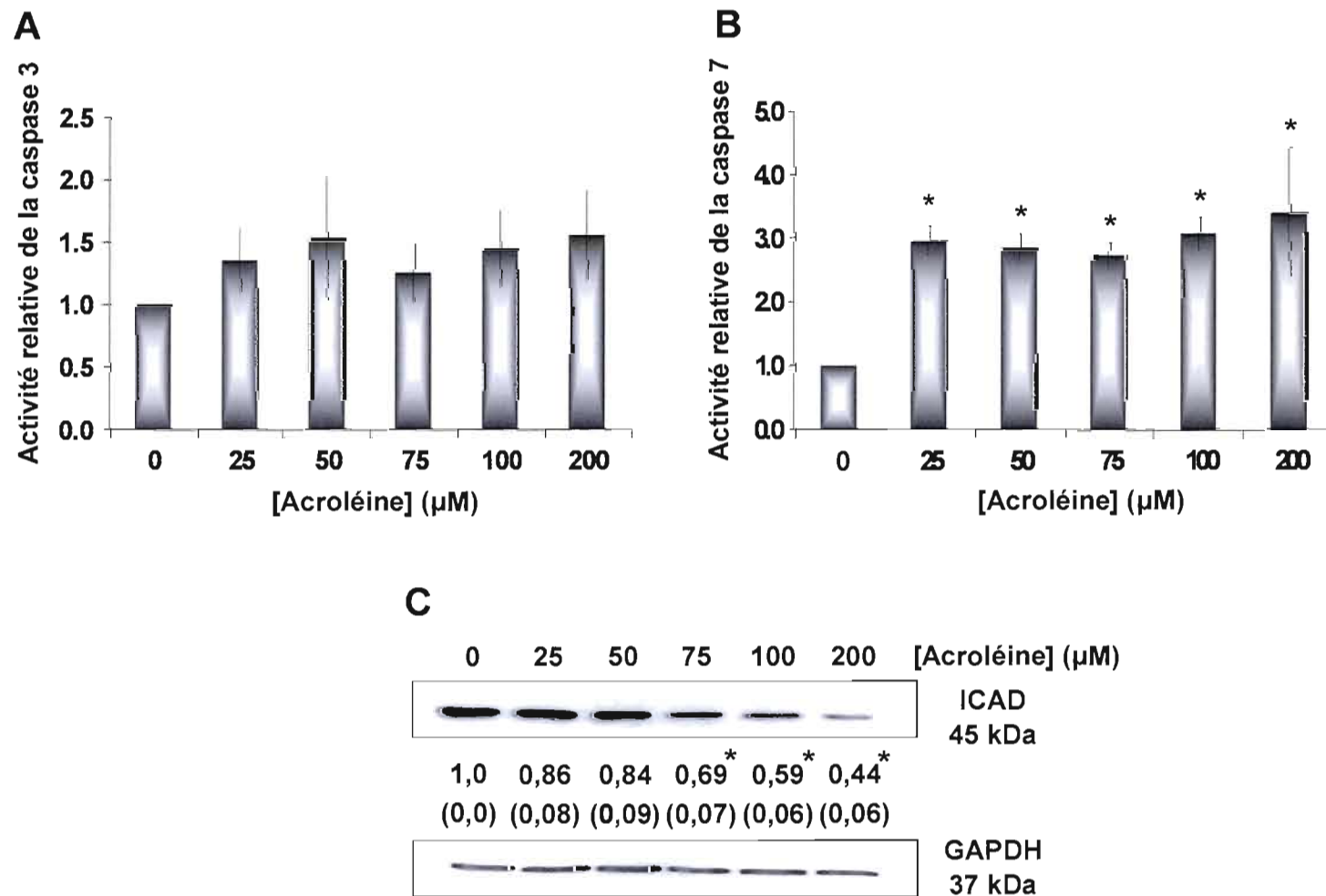


Figure 3.3 A-C

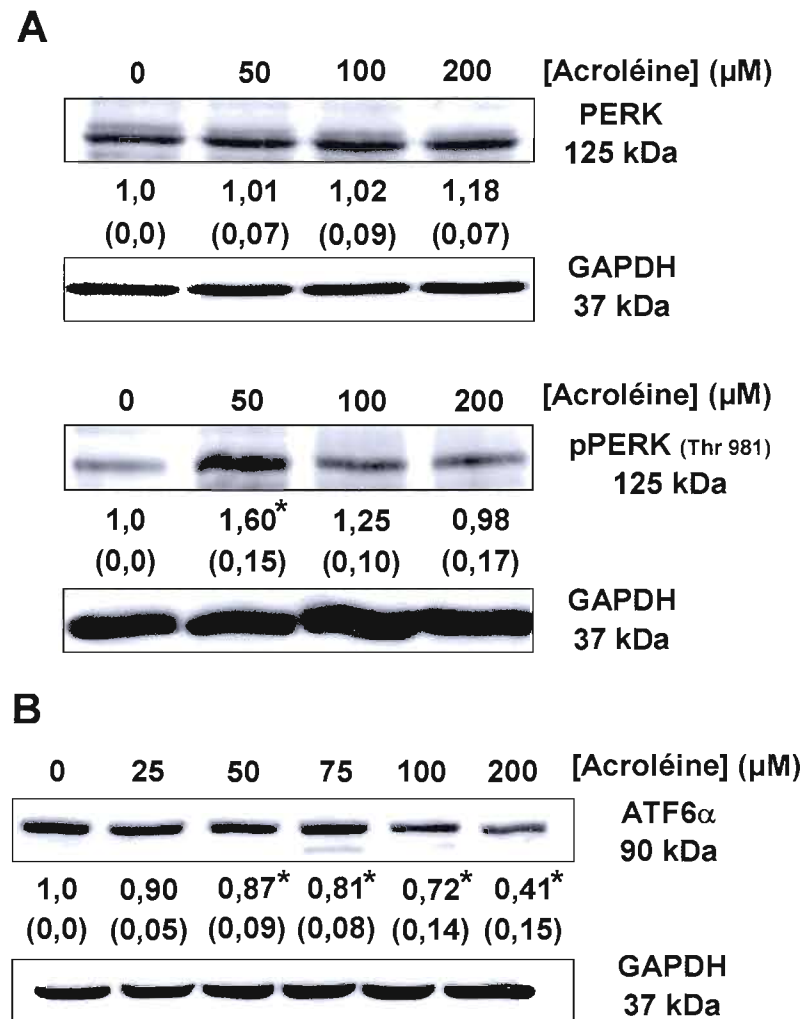
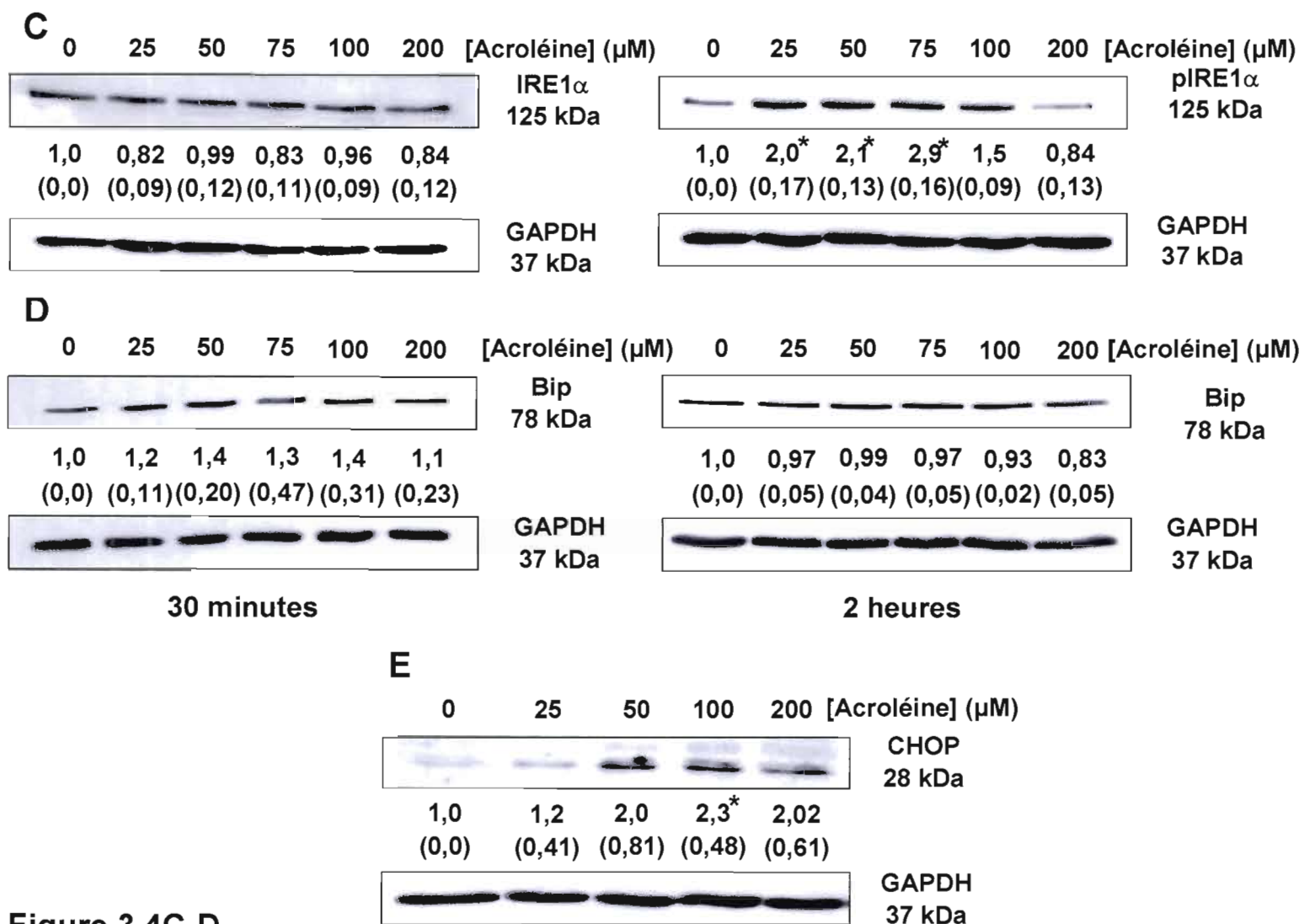


Figure 3.4A-B



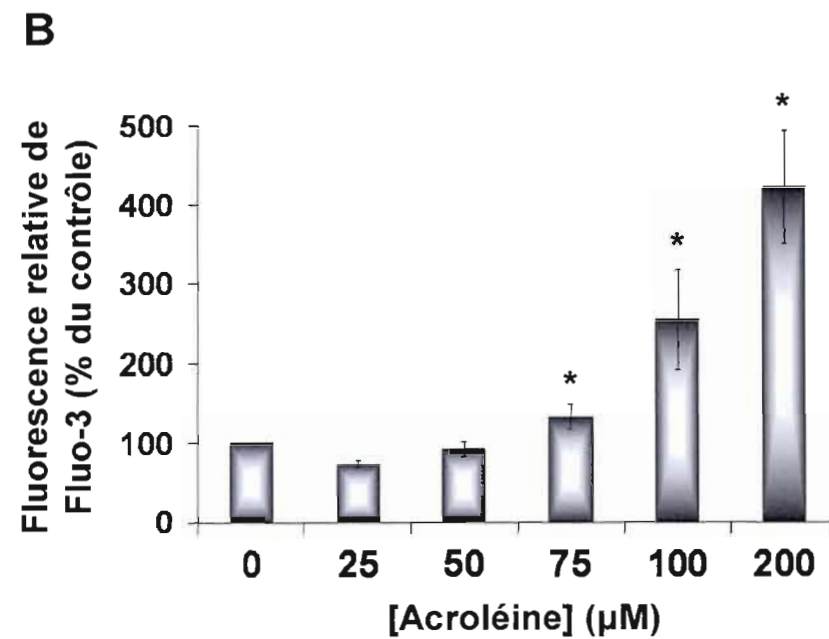
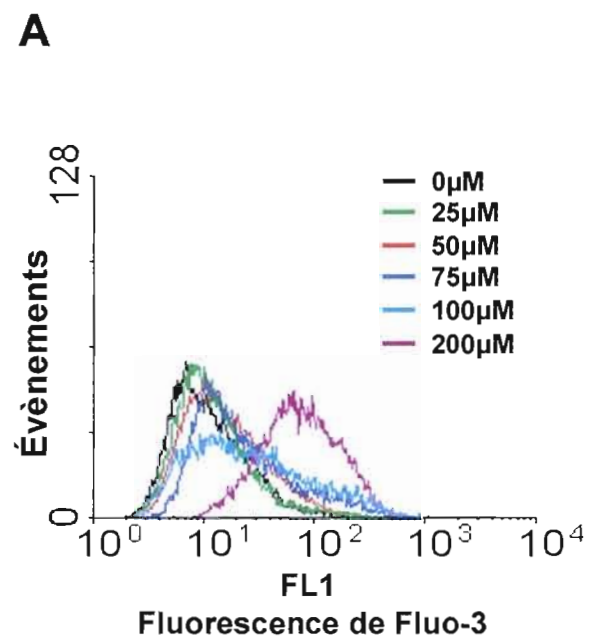


Figure 3.5

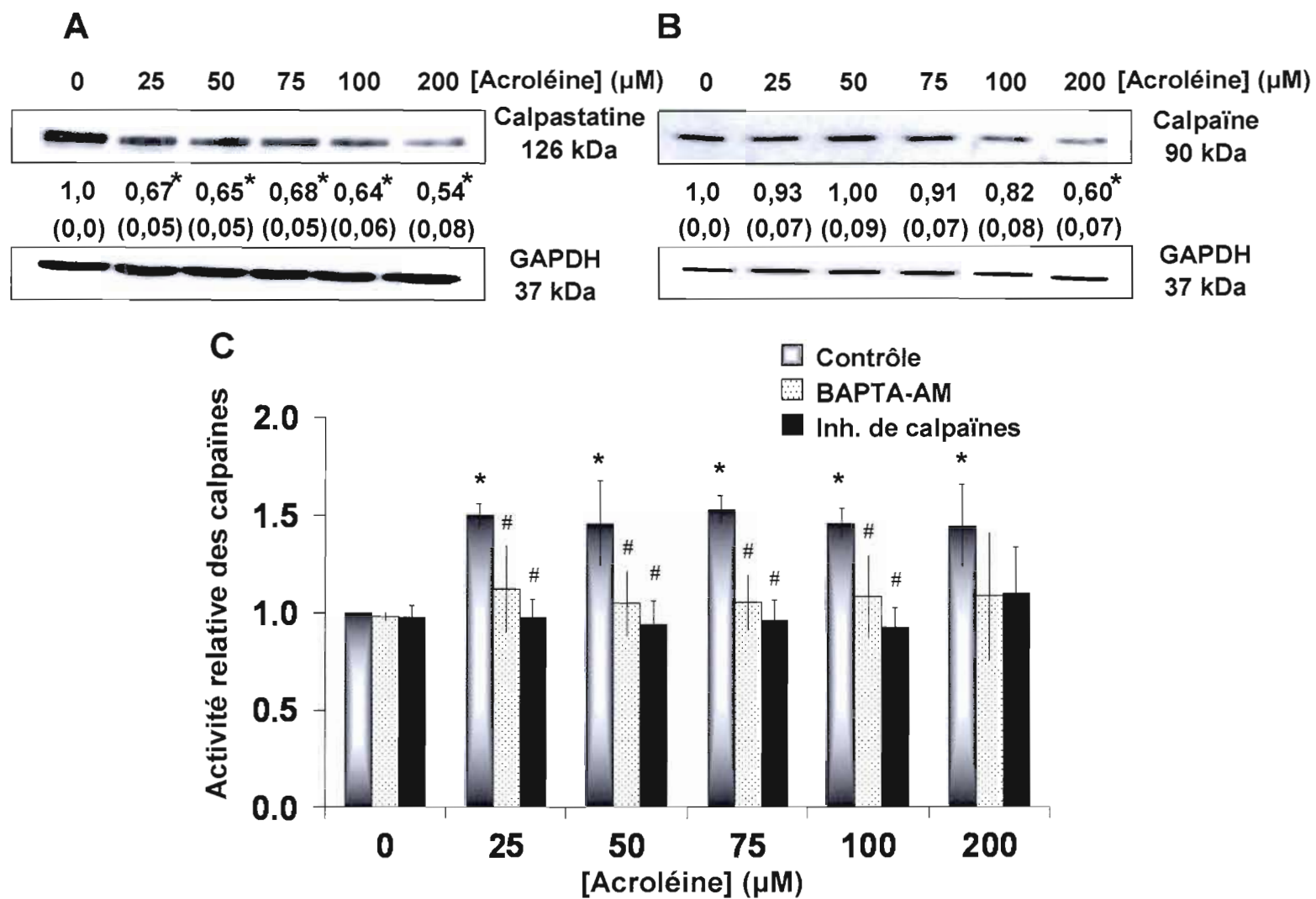


Figure 3.6

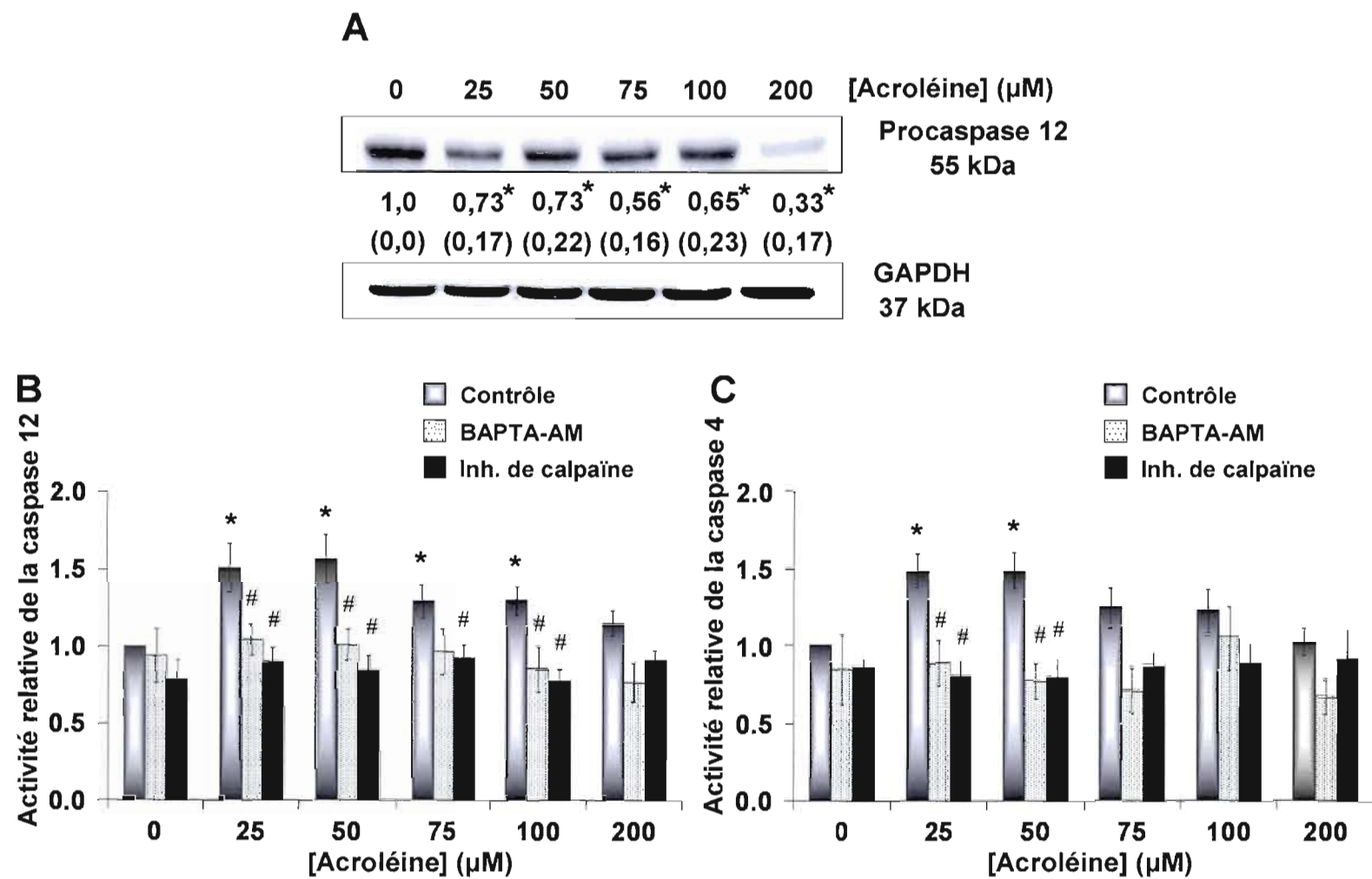


Figure 3.7

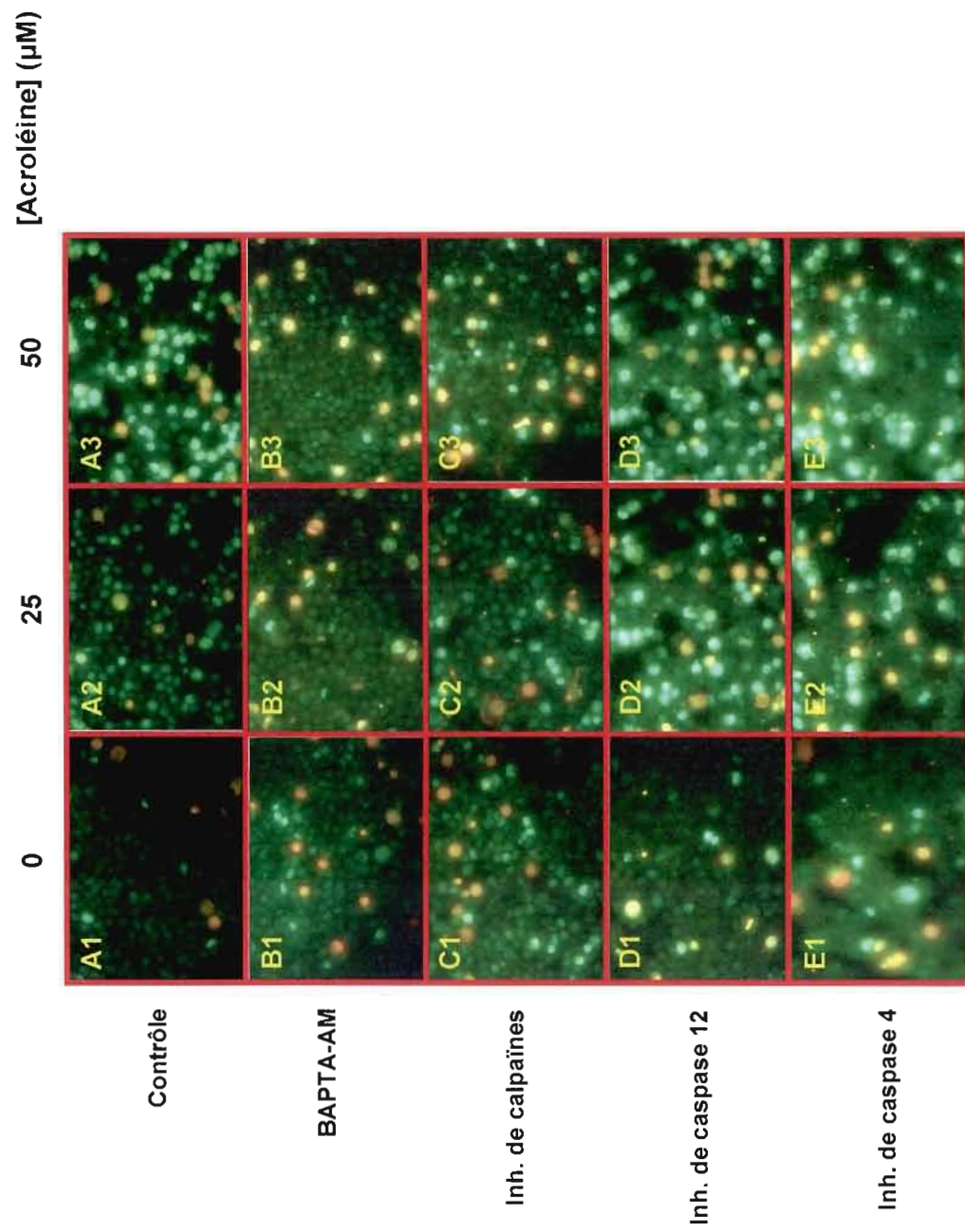


Figure 3.8A-E

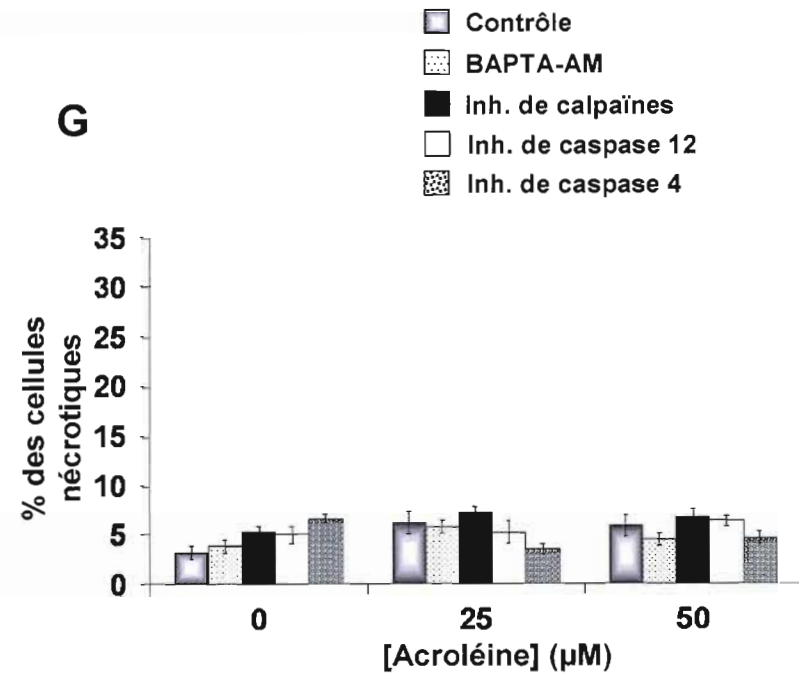
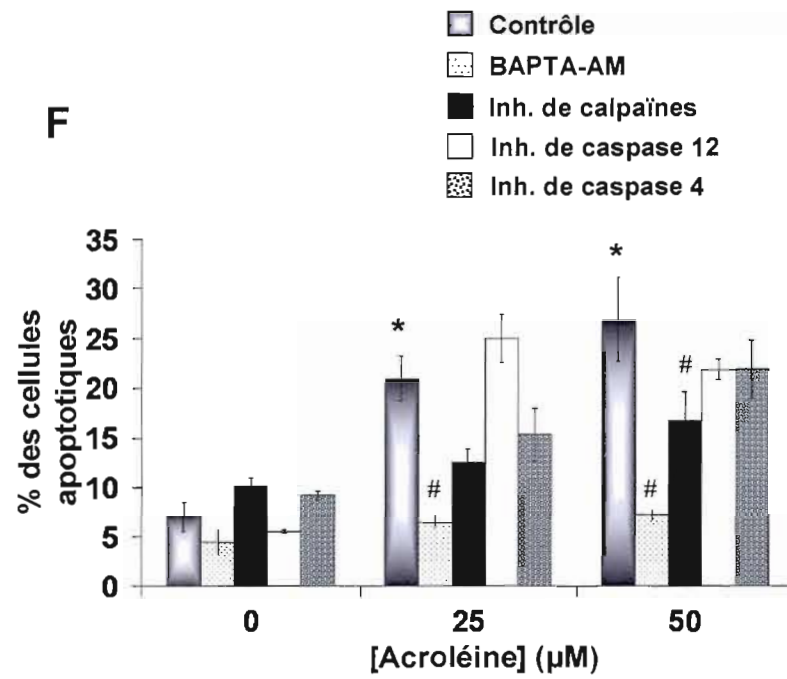


Figure 3.8F-G

3.3 Titres et légendes des figures

Figure 3.1 : L'acroléine induit la condensation de la chromatine des cellules A549.

Les cellules A549 ($1 \times 10^6/\text{ml}$) ont été incubées en présence des différentes concentrations d'acroléine (0-200 μM), dans le milieu α -MEM contenant 10% de FBS, durant 2 ou 4 heures à 37 °C. **A)-D)** Les cellules traitées ont été marquées avec le Hoechst 33258 et le PI et leur morphologie a été observée par microscopie à fluorescence. Les images ainsi obtenues (320X) sont respectivement présentées en **A)** (**A1-A5**) et **B)** (**B1-B5**) pour les traitements avec l'acroléine de 2 et de 4 heures. Les taux d'apoptose et de nécrose **C)** et **D)** ont été évalués par rapport au nombre total des cellules (un minimum de 300 cellules a été compté pour chaque échantillon). Les résultats (moyenne \pm écart-moyen) proviennent de trois expériences indépendantes effectuées avec plusieurs replicatas. * indique une différence significative ($p < 0,05$) par rapport aux cellules témoins (0 μM d'acroléine).

Figure 3.2 : L'acroléine induit l'externalisation de la PS dans les cellules A549.

Les cellules A549 ($1 \times 10^6/\text{ml}$) ont été incubées en présence des différentes concentrations d'acroléine (0-200 μM), dans le milieu α -MEM contenant 10% de FBS, durant 2 heures à 37 °C. Ensuite les cellules ont été marquées avec l'annexine V-FITC et le PI et l'apoptose a été déterminée à l'aide de la cytométrie de flux. La fluorescence de 10 000 cellules a été détectée en FL-1 (annexine V-FITC) et en FL-3 (PI) et les graphiques biparamétriques représentatifs sont présentés en **A)** (cellules contrôle 0 μM d'acroléine), **B)** (50 μM d'acroléine) et **C)** (75 μM d'acroléine). **D)** Les pourcentages (moyenne \pm écart-moyen) des cellules apoptotiques et nécrotiques sont présentés pour trois expériences indépendantes effectuées avec plusieurs replicatas. Les pourcentages associés aux cellules apoptotiques regroupent les populations de cellules annexine V positives. * indique une différence significative ($p < 0,05$) par rapport aux cellules témoins (0 μM d'acroléine).

Figure 3.3 : L'acroléine induit l'activation de la caspase 7 et induit le clivage d'ICAD.

Les cellules A549 ($1 \times 10^6/\text{ml}$) ont été incubées en présence des différentes concentrations d'acroléine (0-200 μM), dans le milieu α -MEM contenant 10% de FBS, durant 2 heures à 37 °C. Ensuite, les cellules ont été lysées et les activités des caspases 3 **A)** et 7 **B)** ont été

respectivement mesurées par fluorimétrie à l'aide des substrats fluorescents Ac-DEVD-AMC et MCA-VDQVDGWK(DNP)-NH₂. Les activités enzymatiques des cellules exposées à l'acroléine ont été exprimées relativement au contrôle (0 μ M d'acroléine) et les valeurs moyennes des activités relatives (\pm écart-type **(A)** ou écart-moyen **(B)**) sont présentées pour au moins trois expériences indépendantes. L'immunodétection d'ICAD (45 kDa) **(C)** a été effectuée dans les lysats cellulaires en employant la GAPDH (37 kDa) comme contrôle de dépôt des échantillons. Les niveaux d'expression d'ICAD ont été mesurés par densitométrie et sont exprimés relativement au contrôle (0 μ M d'acroléine). Les bandes représentatives ainsi que les valeurs moyennes des niveaux d'expression relatifs sont présentées pour au moins trois expériences indépendantes effectuées avec plusieurs replicatas. Les écarts-moyens sont présentés entre parenthèses. * indique une différence significative ($p < 0,05$) par rapport aux cellules témoins (0 μ M d'acroléine).

Figure 3.4 : L'acroléine active les trois branches de la réponse UPR. Les cellules A549 (1×10^6 /ml) ont été incubées en présence des différentes concentrations d'acroléine (0-200 μ M), dans le milieu α -MEM contenant 10% de FBS, durant 30 minutes ou 2 heures à 37 °C. Après l'incubation, les cellules ont été lysées et l'immunodétection de PERK (125 kDa) et de pPERK (125 kDa) **(A)**, d'ATF6 α **(B)**, d'IRE1 α (125 kDa) et de pIRE1 α (125 kDa) **(C)**, de Bip (78 kDa) **(D)** et de CHOP (28 kDa) **(E)** a été effectuée en employant la GAPDH (37 kDa) comme contrôle de dépôt des échantillons. Les niveaux d'expression de ces protéines ont été mesurés par densitométrie et sont exprimés relativement au contrôle (0 μ M d'acroléine). Les bandes représentatives ainsi que les valeurs moyennes des niveaux d'expression relatifs sont présentées pour au moins trois expériences indépendantes. Les écarts-moyens **(A, B, C)** ou les écarts-types **(D, E)** sont présentés entre parenthèses. * indique une différence significative ($p < 0,05$) par rapport aux cellules témoins (0 μ M d'acroléine).

Figure 3.5 : L'acroléine perturbe l'homéostasie calcique. Les cellules A549 (1×10^6 /ml) ont été incubées en présence des différentes concentrations d'acroléine (0-200 μ M), dans le milieu α -MEM contenant 10% de FBS, durant 2 heures à 37 °C. Après l'incubation, les cellules ont été marquées avec la sonde fluorescente fluo-3-AM (4 μ M), durant 45 minutes à l'obscurité, à 37 °C et le changement de la concentration du calcium libre intracellulaire

($[Ca^{2+}]_i$) a été mesuré par cytométrie de flux **A**). Pour chaque échantillon, la fluorescence (FL-1) de 10 000 cellules a été analysée et les valeurs sont exprimées par rapport au contrôle non traité avec l'acroléine (100%) **B**). Le graphique représente les valeurs moyennes et les écarts-moyens des fluorescences relatives de fluo-3 (calculées à partir de la moyenne géométrique des histogrammes) **A**) obtenues à partir de trois expériences indépendantes effectuées avec plusieurs replicatas. * indique une différence significative ($p < 0,05$) par rapport aux cellules témoins (0 μ M d'acroléine).

Figure 3.6 : L'acroléine induit un clivage de la calpastatine et cause l'activation des calpaïnes. Les cellules A549 (1×10^6 /ml) ont été incubées en présence des différentes concentrations d'acroléine (0-200 μ M), dans le milieu α -MEM contenant 10% de FBS, durant 2 heures à 37 °C. Dans les cas indiqués, les cellules ont été pré-incubées avec le BAPTA-AM (50 μ M) ou l'inhibiteur de calpaïne A6185 (10 μ M) durant 1 heure avant le traitement à l'acroléine. Après l'incubation, les cellules ont été lysées. L'immunodétection de calpastatine (126 kDa) **A**) et de calpaïne (90 kDa) **B**) a été effectuée dans les lysats cellulaires en employant la GAPDH (37 kDa) comme contrôle de dépôt des échantillons. Les niveaux d'expression de calpastatine et de calpaïne ont été mesurés par densitométrie et sont exprimés relativement au contrôle (0 μ M d'acroléine). Les bandes représentatives ainsi que les valeurs moyennes des niveaux d'expression relatifs sont présentées pour au moins trois expériences indépendantes effectuées avec plusieurs replicatas. Les écarts-moyens sont présentés entre parenthèses. **C**) L'activité des calpaïnes a été mesurée dans le lysat par fluorimétrie à l'aide du substrat fluorescent Suc-LY-AMC. Les activités enzymatiques des cellules exposées à l'acroléine sont exprimées relativement au contrôle (0 μ M d'acroléine) et les valeurs moyennes des activités relatives ainsi que les écarts-types sont présentés pour trois expériences indépendantes. * indique une différence significative ($p < 0,05$) par rapport aux cellules témoins (0 μ M d'acroléine). # indique une différence significative avec les cellules correspondantes non-prétraitées avec le BAPTA-AM ou l'inhibiteur des calpaïnes.

Figure 3.7 : Mécanisme d'activation des caspases 12 et 4 par l'acroléine. Les cellules A549 ($1 \times 10^6/\text{ml}$) ont été incubées en présence des différentes concentrations d'acroléine (0-200 μM), dans le milieu α -MEM contenant 10% de FBS, durant 2 heures à 37 °C. Dans les cas indiqués, les cellules ont été pré-incubées avec le BAPTA-AM (50 μM) ou l'inhibiteur de calpaïnes A6185 (10 μM) durant 1 heure avant le traitement avec l'acroléine. Après l'incubation, les cellules ont été lysées. **A)** L'immunodétection de la procaspase 12 (55 kDa) a été effectuée dans les lysats cellulaires en employant la GAPDH (37 kDa) comme contrôle de dépôt des échantillons. Les niveaux d'expression de la procaspase 12 ont été mesurés par densitométrie et sont exprimés relativement au contrôle (0 μM d'acroléine). Les bandes représentatives ainsi que les valeurs moyennes des niveaux d'expression relatifs sont présentées pour trois expériences indépendantes. Les écarts-types sont présentés entre parenthèses. Les activités des caspases 12 **B)** et 4 **C)** ont été mesurées respectivement dans le lysat par fluorimétrie à l'aide des substrats fluorescents ATAD-AFC et Ac-LEVD-AFC. Les activités enzymatiques des cellules exposées à l'acroléine sont exprimées relativement au contrôle (0 μM d'acroléine) et les valeurs moyennes des activités relatives (\pm écarts-moyens) sont présentées pour trois expériences indépendantes effectuées avec plusieurs replicatas. * indique une différence significative ($p < 0,05$) par rapport aux cellules témoins (0 μM d'acroléine). # indique une différence significative avec les cellules correspondantes non-prétraitées avec le BAPTA-AM ou l'inhibiteur des calpaïnes.

Figure 3.8 : La chélation du calcium et l'inhibition des calpaïnes protègent les cellules A549 contre l'apoptose induite par l'acroléine. Les cellules A549 ($1 \times 10^6/\text{ml}$) ont été incubées en présence des différentes concentrations d'acroléine (0-200 μM) (**A1-A3**), dans le milieu α -MEM contenant 10% de FBS, durant 2 heures à 37 °C. Dans les cas indiqués, les cellules ont été pré-incubées avec le BAPTA-AM (50 μM) (**B1-B3**), l'inhibiteur de calpaïnes A6185 (10 μM) (**C1-C3**), l'inhibiteur de la caspase 12 Z-ATAD-FMK (10 μM) (**D1-D3**) ou de la caspase 4 Z-YVAD-FMK (20 μM) (**E1-E3**) durant 1 heure avant le traitement à l'acroléine. Les cellules traitées ont été ensuite marquées avec le Hoechst 33258 et le PI et leur morphologie a été observée par microscopie à fluorescence. Les images ainsi obtenues (320X) sont présentées en **A)-E)**. Les taux d'apoptose **F)** et de nécrose **G)** ont été évalués par rapport au nombre total des cellules (un minimum de 300 cellules est compté pour chaque

échantillon). Les données représentent les valeurs moyennes (\pm écart-moyen) obtenues à partir de trois expériences indépendantes effectuées avec plusieurs replicatas. * indique une différence significative ($p < 0,05$) par rapport aux cellules témoins ($0 \mu\text{M}$ d'acroléine). # indique une différence significative avec les cellules correspondantes non-prétraitées avec le BAPTA-AM ou l'inhibiteur des calpaïnes.

CHAPITRE IV DISCUSSION

La présente étude permet d'approfondir notre compréhension des mécanismes de toxicité de l'acroléine dans les cellules d'adénocarcinome pulmonaire A549. Les résultats obtenus montrent que cette substance toxique (25-200 μM) cause la mort apoptotique des cellules épithéliales pulmonaires A549. De plus, nous avons trouvé que cette réponse apoptotique peut impliquer la voie du RE et peut être atténuée par le chélateur de calcium ou par l'inhibiteur des calpaïnes. Cette recherche apporte un nouveau détail concernant le mécanisme de toxicité induite par l'acroléine et peut s'avérer utile lors du développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour contrer les effets toxiques associés à une exposition accrue à l'acroléine.

L'induction de la mort cellulaire par l'acroléine est un phénomène qui dépend du type cellulaire, de la dose ainsi que de la nature du traitement (Tanel et Averill-Bates, 2005; Stevens et Maier, 2008; Thompson et Burcham, 2008b). Ainsi, certains types cellulaires sont plus sensibles que d'autres aux effets toxiques de l'acroléine. Par exemple, l'acroléine (10-25 μM) a induit une réponse apoptotique dans les cellules pulmonaires HBE1. Dans cette étude, l'apoptose a été mise en évidence par l'externalisation de la PS ainsi que par la dégradation de l'ADN qui ont été mesurées 24 heures après un traitement de 30 minutes avec d'acroléine (Nardini *et al.*, 2002). L'acroléine (25 μM , 24 heures) a également induit l'apoptose, dans les macrophages alvéolaires humaines, observée par la fragmentation de l'ADN (Li *et al.*, 1997). Les cellules ovariennes CHO exposées à l'acroléine (25-50 μM , 4 heures) meurent également par apoptose (Tanel et Averill-Bates, 2005). Cependant, l'acroléine présente également des effets d'inhibition de l'apoptose et favorise la réponse nécrotique dans les cellules neuronales PC12 (1-100 μM). Dans ce cas, la nécrose a été associée à une augmentation de la génération des ROS, un dysfonctionnement de la mitochondrie et à une diminution du taux de l'ATP cellulaire (Luo *et al.*, 2005). Dans les mêmes cellules, la nécrose induite par l'acroléine (100 μM , 4 heures) est associée à une détérioration de la structure du cytosquelette, une activation des calpaïnes et à une inhibition de la caspase 3 (Liu-Snyder *et al.*, 2006). Également, l'acroléine induit l'oncose/nécrose dans les cellules lymphoïdes proB (20 μM , 30 min) (Kern

et Kehrer, 2002). Par ailleurs, dans une même lignée cellulaire, l'acroléine peut induire les deux types de réponses cellulaires. Par exemple, les cellules CHO exposées à de faibles concentrations d'acroléine ($<50 \mu\text{M}$) meurent par apoptose alors que des concentrations plus élevées de ce toxique induisent la nécrose (Tanel et Averill-Bates, 2005).

Notre étude montre que l'acroléine (25-200 μM , 2 heures) exerce son effet toxique dans les pneumocytes A549 en déclenchant le processus apoptotique. Cette réponse a été confirmée par l'externalisation de la PS ainsi que par l'étude morphologique de la condensation de la chromatine. De plus, la phase exécutive de l'apoptose induite par l'acroléine dans les cellules pulmonaires A549 a été mise en évidence par l'activation de la caspase 7 ainsi que par le clivage de son substrat physiologique ICAD. Nos résultats montrent qu'il y a une tendance dans l'activation de la caspase 3 sans être un effet significatif. Toutefois, les études précédentes effectuées dans notre laboratoire montrent que l'acroléine cause une activation de la caspase 3 (Roy *et al.*, 2009).

L'activation de la caspase 7 effectrice de l'apoptose par l'acroléine (10-150 fmol/cellule) a également été rapportée dans les cellules ovariennes CHO suite à un traitement de 1 et 2 heures. Cette étude montre également qu'après 2 heures, l'acroléine (50-200 μM) induit un clivage d'ICAD (Tanel et Averill-Bates, 2005). Cependant, l'acroléine peut également inhiber l'activité des caspases. Ainsi, l'acroléine (5-20 μM , 5 minutes à 1 heure) inhibe l'activité de la caspase 3 dans les cellules ovariennes CHO (Tanel et Averill-Bates, 2005). D'autres études montrent également que l'acroléine (10 μM , 2 à 8 heures) inhibe l'activité de la caspase 3 dans les neutrophiles (Finkelstein *et al.*, 2004). Les activités des caspases 3, 8 et 9 sont aussi inhibées dans les cellules lymphoïdes proB, 12 heures suivant un traitement de 30 minutes à l'acroléine (5 à 40 μM d'acroléine) (Kern et Kehrer, 2002). Étant donné que les caspases sont des protéases à cystéine, il est probable que l'acroléine inhibe l'activité de ces enzymes en alkylant les cystéines du site actif. En effet, il est possible que l'acroléine active et en même temps inhibe l'activité des caspases (Tanel et Averill-Bates, 2005). Étant donné que le site actif de chaque caspase est différent, il est possible que certaines caspases soient plus susceptibles que d'autres à l'inactivation par l'acroléine (Tanel et Averill-Bates, 2005).

Nos résultats montrent que l'acroléine (25-200 μM , 2 heures) induit l'apoptose dans les cellules A549. Toutefois, il est possible qu'une exposition plus prolongée ou des concentrations plus élevées d'acroléine soient responsables de l'induction de la mort nécrotique dans les cellules A549. D'ailleurs, Izumi et chercheurs (2001) ont montré qu'une exposition de 48 heures à 500 μM d'acroléine cause la nécrose dans les cellules A549 (Hoshino *et al.*, 2001).

Les concentrations d'acroléine (0-200 μM) utilisées dans nos expériences regroupent les concentrations de ce toxique susceptibles d'être présentes *in vivo*. En effet, dans le sérum d'un sujet sain, la concentration d'acroléine est estimée à 50 μM (Satoh *et al.*, 1999). De plus, des concentrations de 80 μM d'acroléine ont été estimées dans les fluides respiratoires suite à une solubilisation complète de la fumée de cigarette provenant d'une seule cigarette qui contient 0,8 μmol d'acroléine (Eiserich *et al.*, 1995). Toutefois, il est probable que des concentrations plus importantes d'acroléine soient retrouvées dans les fluides respiratoires des fumeurs chroniques. L'acroléine pourrait également être présente en plus grandes quantités dans les sites inflammatoires et pathologiques caractérisés par un stress oxydatif accrue. Suite à une lésion, la concentration d'acroléine pourrait augmenter avec le temps puisque les cellules endommagées peuvent libérer l'acroléine dans l'espace interstitiel (Tanel et Averill-Bates, 2005). Il est important de noter que chez les personnes en santé, les substances antioxydantes présentes dans les fluides respiratoires, comme le glutathion et l' α -tocophérol, protègent les cellules pulmonaires contre les effets toxiques de l'acroléine présente dans le smog ou la fumée de tabac. Cependant, la concentration des antioxydants peut diminuer dans plusieurs conditions pathologiques et par la fumée de cigarette (Carp et Janoff, 1978; Nardini *et al.*, 2002) rendant ainsi les cellules plus susceptibles aux effets toxiques de l'acroléine. Par ailleurs, dans notre étude, l'acroléine (25-200 μM) a induit la mort cellulaire suite un traitement de courte durée (2 à 4 heures). Dans les conditions physiologiques les humains ou d'autres espèces sont plus susceptibles à être exposés à de faibles concentrations d'acroléine présente dans l'environnement de façon chronique. Ceci pourrait résulter en une plus importante toxicité de l'acroléine.

Les études précédentes montrent que dans les cellules pulmonaires A549, l'acroléine exerce son effet toxique en causant une déplétion du glutathion et de la thioredoxine (Horton *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2004). Ceci rompt la balance d'oxydoréduction et entraîne une modulation de plusieurs voies biochimiques cellulaires. Dans les cellules pulmonaires HBE1, la déplétion du GSH ainsi que la génération des espèces oxydantes causées par l'acroléine ont été associées à l'apoptose (Nardini *et al.*, 2002). Récemment, Thompson et Burcham (2008a) ont montré que l'acroléine cause une dérégulation dans la signalisation de l'apoptose, du contrôle du cycle cellulaire, de la transcription ainsi que de la biosynthèse protéique dans les cellules épithéliales A549. La dérégulation de la voie apoptotique par l'acroléine est également observée dans nos résultats qui montrent une induction de cette réponse dans les pneumocytes A549. De plus, l'étude de Thompson et Burcham (2008a) montre que l'acroléine induit l'expression de la protéine pro-apoptotique Nur77 et cause une libération du cyt c dans le cytosol suite à un traitement de 6 heures avec 100 μM d'acroléine dans les cellules A549. Dans les cellules A549, le même effet a été observé suite à un traitement plus prolongé (24 heures) avec des concentrations d'acroléine plus faibles (25 et 50 μM) (Thompson et Burcham, 2009a).

Cependant, les études antérieures de notre laboratoire montrent que de plus faibles concentrations d'acroléine (1-50 μM) activent la voie des récepteurs de mort ainsi que la voie mitochondriale de l'apoptose dans les cellules A549 et dans les cellules CHO suite à un traitement de 30 minutes à 2 heures (Roy *et al.*, 2010 ; Tanel et Averill-Bates, 2005 ; 2007a,b). Plus précisément, l'activation de la voie de récepteurs de mort par l'acroléine dans les cellules A549 et CHO se traduit par une augmentation de l'expression du ligand de Fas, un recrutement de FADD au niveau de la membrane cytoplasmique et par une activation de la caspase 8 (Tanel et Averill-Bates, 2007a, Roy *et al.*, 2010). Dans les mêmes cellules l'acroléine a également induit le clivage de bid et a activé la voie mitochondriale de l'apoptose mise en évidence, entre autres, par une libération du cyt c dans le cytosol et par une activation de la caspase 9 (Tanel et Averill-Bates, 2005 ; 2007a, Roy *et al.*, 2009). De plus, dans les cellules CHO, l'apoptose induite par l'acroléine implique également la voie de signalisation des MAPK p38 et ERK (Tanel et Averill-Bates, 2007c).

Afin de davantage éclaircir les mécanismes de toxicité de l'acroléine, nous avons étudié l'implication de la voie du RE dans la transduction du signal apoptotique induit par cette substance toxique dans les cellules A549. Il est connu que l'acroléine entraîne l'alkylation des résidus cystéines des protéines et altère ainsi leurs structures et leurs fonctions. Une des nombreuses enzymes modifiées par l'acroléine est la disulfure isomérase qui est impliquée dans la maturation des protéines au niveau du RE en catalysant la formation des ponts disulfures (Carbone *et al.*, 2005; Liu et Sok, 2004). Par conséquent, l'acroléine, en modifiant les protéines et en inhibant la disulfure isomérase, pourrait interférer avec le processus normal de maturation des protéines et favoriser ainsi l'accumulation des protéines à conformation anormale au niveau du RE, une condition de stress du RE.

Plusieurs données de notre étude suggèrent que l'acroléine déclenche un stress du RE et induit la réponse UPR dans les cellules pulmonaires A549. Plus précisément, l'acroléine (25-200 μ M, 2 heures) est responsable de l'activation des trois branches de la réponse UPR tel que montré par l'induction de la phosphorylation des kinases PERK et IRE1 α ainsi que par le clivage du facteur de transcription ATF6 α dans les cellules A549.

La réponse UPR est principalement déclenchée pour contrer les effets toxiques du stress du RE en atténuant la synthèse générale des protéines et en augmentant la capacité cellulaire de repliement protéique (induction des protéines chaperonnes) ainsi que l'élimination des protéines à conformation anormale. Toutefois, lorsque les mécanismes de survie de la réponse UPR sont incapables de prendre en charge l'excès des protéines mal repliées dans le RE, les trois protéines (PERK, ATF6 α , et IRE1 α) impliquées dans la réponse UPR contribuent à l'induction de l'apoptose par la voie du RE (Boyce et Yuan, 2006; Lai *et al.*, 2007; Schroder et Kaufman, 2005). Nous avons examiné l'expression de la protéine chaperonne Bip dans les cellules A549. Nos résultats montrent que l'acroléine (25-200 μ M) n'a pas induit d'expression significative de Bip. Ce résultat est surprenant puisque dans ces conditions de traitement la réponse UPR est induite et une augmentation de l'expression de Bip est attendue. Il est possible que ces conditions de stress sont trop intenses ou de trop longue durée ce qui perturbe la signalisation normale de la réponse UPR et empêche l'expression de la protéine Bip. Les résultats publiés par Volchuk et chercheurs (2008)

montrent également que l'induction de la réponse UPR dans les cellules pancréatiques β (INS-I 832/13) n'a pas induit l'expression de la protéine Bip suite à des traitements prolongés avec des concentrations élevées de glucose (Zhang *et al.*, 2009).

L'induction de la réponse UPR, par l'acroléine, est également observée dans les cellules endothéliales HUVEC (Haberzettl *et al.*, 2009). Plus précisément, de plus faibles concentrations d'acroléine (2-25 μ M) ont induit la phosphorylation d'eIF2 α suite à un traitement de 10 à 30 minutes. Dans la même étude, l'acroléine (5-25 μ M) a induit un épissage de l'ARNm codant pour XBP1 après 2 heures de traitement et l'expression de l'ATF4 a été induite après 4 heures. Cependant, l'expression de la protéine CHOP n'a pas été détectée suite à un traitement de 12 heures avec l'acroléine (10 μ M) dans les cellules HUVEC. De plus, dans ce modèle cellulaire, les conditions de traitement (concentration d'acroléine, temps d'exposition) n'induisent pas la mort des cellules HUVEC mais causent l'activation du NF- κ B et favorisent la production des cytokines (Haberzettl *et al.*, 2009). Par ailleurs, l'activation de la voie de PERK par l'acroléine (6,2-8,3 μ M, 1.5 heures) a également été rapportée dans les fibroblastes 3T3 où elle est associée à la survie cellulaire (Hengstermann et Muller, 2008). Dans notre étude nous avons employé des concentrations plus élevées d'acroléine. Toutefois, les nouvelles études effectuées dans notre laboratoire montrent que de plus faibles concentrations d'acroléine (< 25 μ M) et des temps d'expositions plus courts induisent également la réponse UPR dans les cellules A549. De plus, dans les études citées plus haut le traitement de l'acroléine a été effectué dans le milieu sans sérum alors que nos traitements s'effectuent en présence de 10% de FBS. Il est connu que l'acroléine réagit rapidement avec les protéines du sérum ce qui diminue la concentration d'acroléine disponible pour exercer des effets toxiques sur les cellules A549 (Thompson et Burcham, 2008b ; Tanel et Averill-Bates, 2005). De plus, certains types cellulaires sont plus sensibles que d'autres aux effets toxiques de l'acroléine. Il est connu que les cellules cancéreuses dont les cellules A549 ont un contenu plus élevé en GSH comparé aux cellules non cancéreuses (fibroblastes immortalisés 3T3 et culture primaire des cellules HUVEC) (Kehrer et Biswal, 2000). Étant donné que l'acroléine est hautement électrophile, une plus grande quantité du GSH peut protéger les cellules contre les effets toxiques de ce produit nocif.

Dans notre modèle cellulaire, l'acroléine après 2 heures induit une réponse UPR en même temps que le processus apoptotique. Toutefois, il est connu que la réponse UPR, qui favorise la survie cellulaire, est généralement induite avant l'apoptose. Les nouvelles études de notre laboratoire montrent que la réponse UPR est également induite avant l'apoptose. Toutefois, d'après nos résultats, elle reste aussi activée durant l'induction de l'apoptose. D'ailleurs il est connu qu'une activation prolongée des trois protéines (PERK, ATF6 α et IRE1 α) impliquées dans réponse UPR peut éventuellement résulter en une induction de l'apoptose par la voie du RE (Szegezdi *et al.*, 2006). En accord avec nos résultats, la réponse UPR demeure activée durant l'induction de l'apoptose dans d'autres modèles cellulaires. Par exemple, Samali et chercheurs (2006) ont montré que l'ischémie induit l'activation des trois branches de la réponse UPR avant d'induire l'apoptose dans les cultures primaires de cardiomyocytes de rat. Dans cette étude les trois branches de la réponse UPR ont demeurées actives durant l'induction de CHOP, l'activation des caspases 12 et 3 (Szegezdi *et al.*, 2006). En accord avec ces résultats, un traitement de 24 heures avec 0,3 mM de peroxyde d'hydrogène active la voie de PERK/eIF2 α et simultanément la voie apoptotique tel qu'observée avec le clivage des caspase 3, 4, 8, et 9 et avec la libération du cyt c dans le cytosol dans les cellules cancéreuses orales (HN4) et les kératinocytes immortalisés humains (IHOK) (Min *et al.*, 2008). D'un autre côté, Lai et Wong (2008) ont montré que l'activation de la voie PERK/eIF2 α est impliquée dans la toxicité induite par le N-(4-hydroxyphényl)-rétinamide dans les cellules humaines cervicales cancéreuses HeLa incapables de déclencher l'autophagie (Lai et Wong, 2008). Il sera intéressant d'étudier les effets de l'inhibition de la réponse UPR sur l'apoptose induite par l'acroléine dans les cellules cancéreuses pulmonaires A549.

Dans notre étude, nous avons étudié l'induction du stress du RE par l'acroléine en observant le déclenchement de la réponse UPR. Cependant, il est également possible d'étudier le potentiel de l'acroléine à induire un stress du RE en analysant le potentiel oxydant du RE. En effet, le processus normal de repliement des protéines requiert un environnement oxydant. Ce potentiel oxydant du RE est perturbé lors d'un stress. Papa et collègues (2008) ont étudié la perte de ce potentiel oxydant dans les levures à l'aide d'une protéine verte fluorescente (GFP) adressée au RE qui est sensible à l'état d'oxydoréduction

(Merksamer *et al.*, 2008). Il est également possible de mettre en évidence la capacité de l'acroléine à induire le stress du RE en mesurant l'activité de l'enzyme PDI qui est impliquée dans les processus de repliement des protéines. Ainsi, en incubant les lysats cellulaires en présence de l'insuline bovine, il est possible de mettre en évidence l'activité de la PDI en mesurant la turbidité à 650 nm (Lovat *et al.*, 2008).

La cause précise d'induction du stress du RE, par l'acroléine, n'a pas été explorée dans notre étude. Toutefois, il est connu que cette substance toxique provoque une déplétion du glutathion (Biswal *et al.*, 2002; Ghilarducci et Tjeerdema, 1995), perturbe l'homéostasie calcique (Hyvelin *et al.*, 2000; Misonou *et al.*, 2006), entraîne des modifications covalentes des protéines (Burcham *et al.*, 2007; Uchida *et al.*, 1998a) et augmente la génération des ROS (Adams et Klaidman, 1993). Ainsi, tous ces effets toxiques de l'acroléine peuvent interférer avec le processus normal de repliement des protéines au niveau du RE et induire ainsi un stress du RE qui déclenche la réponse UPR.

Le stress induit par un traitement de 2 heures avec l'acroléine dans les cellules pulmonaires A549 est assez rigoureux pour induire la réponse apoptotique médiée par la voie du RE. En effet, notre étude montre qu'une exposition de 2 heures d'acroléine cause une induction du facteur de transcription pro-apoptogène CHOP, une augmentation du taux de calcium libre intracellulaire qui est responsable de l'activation des calpaïnes qui à leur tour activent les caspases 12 et 4 propageant ainsi le signal apoptotique.

La protéine CHOP est exprimée faiblement dans les cellules normales. Dans les conditions d'un stress sévère ou prolongé du RE, les trois voies de la réponse UPR induisent la transcription du gène codant pour la protéine CHOP (Harding *et al.*, 2000; Lai *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2002; Okada *et al.*, 2002). Le rôle de CHOP dans l'induction de l'apoptose n'est pas encore bien compris, toutefois il est connu que ce facteur de transcription régule à la hausse plusieurs gènes impliqués dans l'apoptose (Marciniak *et al.*, 2004; Sok *et al.*, 1999; Yoshida, 2007a). De plus, CHOP peut favoriser l'apoptose en régulant à la baisse l'expression des protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 et en favorisant la génération des ROS dans les cellules via la déplétion du glutathion (Lai *et al.*, 2007;

McCullough *et al.*, 2001; Yamaguchi et Wang, 2004). Le mécanisme exact de la déplétion du GSH par le facteur de transcription CHOP n'est pas encore compris. Toutefois, Holbrook et chercheurs (2001) suggèrent que CHOP pourrait interférer avec la biosynthèse du GSH causant ainsi son déplétion (McCullough *et al.*, 2001).

Dans notre étude, un traitement de 2 heures avec 100 μM d'acroléine cause une augmentation de l'expression de CHOP. Les concentrations de 50 et 200 μM d'acroléine semblent également réguler à la hausse l'expression de CHOP. Toutefois à cause de la grande variation entre les données avec ces concentrations, plus d'études sont nécessaires pour confirmer cet effet. Ces résultats sont en accord avec l'étude récente de Thompson et Burcham (2008a) qui montre qu'un traitement de 1, 2 et 4 heures avec 100 μM d'acroléine induisent une augmentation de l'ARNm codant pour la protéine CHOP dans les cellules A549. Par ailleurs, Kehrer et collaborateurs (1997) n'ont pas détecté l'ARNm de CHOP dans les cellules A549 exposées 2 heures à 35 fmol/cellule d'acroléine (Horton *et al.*, 1997). Nos résultats montrent également que de plus faibles concentrations d'acroléine (25 μM) n'augmentent pas l'expression de CHOP. Cette observation peut suggérer que différentes concentrations d'acroléine peuvent activer différents mécanismes de mort cellulaire. D'un autre côté, Bhatnagar et collègues (2009) ont récemment montré que de faibles concentrations d'acroléine (10 μM) ont augmenté l'expression de l'ARNm de CHOP dans les cellules HUVEC suite à un traitement de 6 heures. Toutefois, il est important de mentionner que les chercheurs n'ont pas été en mesure de détecter l'expression de la protéine CHOP après un traitement de 6 ou 12 heures avec 10 et 25 μM d'acroléine. De plus, ces conditions de traitement ne causent pas l'apoptose dans les cellules en question (Haberzettl *et al.*, 2009). Ainsi, l'induction de la protéine CHOP par l'acroléine peut favoriser la mort apoptotique des cellules A549.

La perturbation de l'homéostasie calcique induite par l'acroléine dans les pneumocytes A549 peut constituer une conséquence ou une cause d'un stress du RE. En effet, il est connu que le processus de repliement des protéines requiert une homéostasie calcique qui régule l'activité de plusieurs protéines chaperonnes (Schroder, 2006). Mise à part la régulation de l'activité des protéines chaperonnes, le calcium est également impliqué dans la

maturation des protéines glycosylées et dans l'assemblage des différentes sous-unités des protéines (Görlach *et al.*, 2006). Par conséquent, la mobilisation du calcium induite par l'acroléine pourrait nuire au processus normal de maturation des protéines et induire ainsi un stress du RE. Par ailleurs, le stress du RE induit par l'acroléine pourrait entraîner la libération du calcium à partir du RE. Plus précisément, le stress du RE cause une accumulation des protéines à domaines BH3 au niveau de la membrane du RE favorisant ainsi la formation des pores qui permettent la libération du calcium (Lai *et al.*, 2007; Zong *et al.*, 2003). Nos résultats montrent que l'acroléine (75-200 μM , 2 heures) perturbe l'homéostasie calcique en augmentant le taux de calcium libre intracellulaire dans les pneumocytes A549. Par contre, de faibles concentrations d'acroléine (25-50 μM) n'ont pas causé une élévation du taux de calcium libre intracellulaire. Toutefois, nous avons trouvé que la chélation de cet ion divalent avec le BAPTA-AM, dans ces conditions, protège les pneumocytes contre l'apoptose induite par l'acroléine. Il est probable que dans ces conditions, il y ait une faible augmentation du calcium libre total qui n'est pas détectable par cytométrie de flux. Cependant, la concentration de cet ion divalent au niveau de la membrane du RE ou de la mitochondrie pourrait favoriser la signalisation pro-apoptogène.

Afin de mesurer ce mouvement calcique, des études de microscopie confocale devraient être réalisées. Pour mieux visualiser les déplacements du calcium, il est possible de marquer les cellules A549 avec des sondes fluorescentes spécifiques pour chaque organelle avant l'ajout de fluo-3-AM. Par exemple, le *mito-tracker* pour la mitochondrie et le *ER-tracker* pour le RE (Paemeleire *et al.*, 2000). Un autre moyen de mesurer le flux calcique à partir du RE est l'utilisation de l'aequorine qui est une photoprotéine sensible au calcium isolée à partir d'une méduse luminescente (*Aequorea victoria*). Lorsque liée au calcium, l'aequorine change de conformation, passe à un état excité et devient fluorescente dans le bleu. Le complexe excité émet de la lumière bleue à 469 nm lorsqu'il revient à l'état fondamental. Ainsi, il est possible de mesurer les photons émis dans le visible à l'aide d'un photomultiplicateur et de quantifier le calcium à l'aide d'une courbe de calibration. En employant les vecteurs d'expression des aequorines adressées à la mitochondrie (mit-AEQ) ou au RE (RE-AEQ), il est possible de mesurer la concentration du calcium libre de chaque organite (Pinton *et al.*, 2007; Alvarez et Montero, 2002).

Nos résultats concordent avec les études précédentes qui démontrent que l'acroléine entraîne une dérégulation de l'homéostasie dans plusieurs modèles cellulaires. Ainsi, un traitement de 24 heures avec 50 μM d'acroléine cause une augmentation de calcium libre cytosolique dans les cellules d'épithélium pigmentaire rétinien (Jia *et al.*, 2007). Des concentrations plus faibles (25 μM) ont induit une élévation du taux de calcium libre dans les cellules endothéliales HUVEC (Misonou *et al.*, 2006). D'un autre côté, de plus importantes concentrations d'acroléine (150 μM) ont provoqué une augmentation du calcium libre intracellulaire dans les cellules du tubule proximal (Schwerdt *et al.*, 2006).

La libération du calcium à partir du RE induit par l'acroléine peut être expliquée par plusieurs mécanismes. Tout d'abord, l'acroléine est une substance très réactive et très électrophile qui cause des dommages au niveau de la membrane plasmique. En plus de la membrane plasmique, l'acroléine pourrait endommager la membrane du RE et ainsi provoquer une libération du calcium à partir de cet organelle (Misonou *et al.*, 2006). Par ailleurs, les études de Mathan et chercheurs (2000) montrent que l'acroléine peut augmenter la production de l'inositol-(1,4,5)-triphosphate (InsP_3) dans les myocytes lisses des voies respiratoires au cours d'une stimulation muscarinique (Hyvelin *et al.*, 2000). L' InsP_3 ainsi généré peut activer le récepteur d' InsP_3 qui transporte le calcium du RE vers le cytosol (Foskett *et al.*, 2007). Des études antérieures de notre laboratoire montrent que de faibles concentrations d'acroléine (3-14 μM) causent, après 30 minutes, une libération du cyt c à partir de la mitochondrie dans les cellules A549 (Roy *et al.*, 2009). Il est connu que le cyt c s'associe au récepteur d' InsP_3 et favorise la libération du calcium à partir du RE (Boehning *et al.*, 2003 ; Haidara *et al.*, 2008). Par conséquent, il est possible qu'il ait une interaction entre la voie mitochondriale et la voie du RE dans l'apoptose induite par l'acroléine dans les cellules A549.

L'augmentation du calcium libre intracellulaire peut induire plusieurs événements pro-apoptotiques. Notre étude souligne l'implication du flux calcique induit par l'acroléine dans l'activation des calpaïnes. Nous avons montré l'activation de ces protéases à cystéine dépendante de calcium par immunobuvardage et par fluorimétrie. Plus précisément, l'activation des calpaïnes par le traitement à l'acroléine a été associée à un clivage de

l'inhibiteur physiologique des calpaïnes, le calpastatine. Cet événement, ainsi que l'augmentation du calcium libre intracellulaire constituent les mécanismes d'activation de ces protéases (Croall et Ersfeld, 2007; Wu *et al.*, 2007). Le rôle du calcium dans l'activation des calpaïnes a été mis en évidence grâce au chélateur BAPTA-AM qui empêche l'activation de ces protéases induite par l'acroléine dans les cellules A549. De plus, nos observations montrent que le BAPTA-AM ainsi que l'inhibiteur des calpaïnes préviennent la condensation de la chromatine des cellules pulmonaires A549 exposées à l'acroléine. Ceci indique que la réponse apoptotique induite par l'acroléine implique le calcium et l'activation des calpaïnes dans notre modèle cellulaire.

En accord avec nos résultats, l'activation des calpaïnes par l'acroléine a également été rapportée dans d'autres études. Borgens et collègues (2006) ont montré que 100 μM d'acroléine cause une augmentation de l'activité des calpaïnes dans les cellules cancéreuses dérivées du phéochromocytome de la médullosurrénale d'un rat PC12 mesurée entre 0 et 4 heures de traitement (Liu Snyder *et al.*, 2006). Toutefois, dans ce cas, l'activation des calpaïnes n'a pas été associée avec l'apoptose mais avec la mort nécrotique. Tel que discuté plus haut, la nature de la réponse induite par l'acroléine varie selon le type cellulaire. L'activation des calpaïnes a également été étudiée dans les cellules endothéliales de l'artère pulmonaire porcine. Dans ce cas une faible concentration d'acroléine (5 μM) n'a pas induit l'activation des calpaïnes après 24 heures de traitement (Zhang *et al.*, 1998). Nos résultats montrent que l'acroléine (25-200 μM) induit l'activation des calpaïnes dans les cellules A549 après un traitement de 2 heures et cette activation est impliquée dans l'apoptose induite par l'acroléine.

Une fois activées par l'acroléine, les calpaïnes peuvent traduire le signal apoptotique en activant les caspases initiateuses 12 et 4. Les caspases 12 et 4, localisées du côté cytoplasmique du RE, jouent un rôle central dans la transduction du signal apoptotique induit par la voie du RE (Hitomi *et al.*, 2004; Nakagawa *et al.*, 2000). Nos résultats montrent que l'acroléine entraîne l'activation de ces caspases dans les cellules A549. De plus, cette activité des caspases 4 et 12 est atténuée par BAPTA-AM et par l'inhibiteur des calpaïnes suggérant l'implication de ces facteurs dans leurs activations. Dans notre étude, les concentrations de 25

à 100 μM ont induit l'activation de la caspase 12 alors que seulement de faibles concentrations (25 et 50 μM) ont eu un effet significatif sur l'activité de la caspase 4. Tel que discuté plus haut, il est probable qu'aux plus fortes concentrations d'acroléine (75-200 μM) l'inhibition de la caspase 4 est plus importante que son activation. Par ailleurs, une concentration de 200 μM d'acroléine a causé un clivage de la caspase 12 alors que l'activité de l'enzyme n'a pas été détectée par fluorimétrie. Ceci peut être expliqué par le fait que le clivage des caspases n'est pas toujours associé à leurs activations. En effet, Tanel et Averill-Bates (2005) ont montré que même si l'acroléine induit un clivage de la caspase 3, l'activité de cette enzyme a été immédiatement inhibée par l'acroléine dans les cellules ovariennes CHO (Tanel et Averill-Bates, 2005).

La caspase 12 fonctionnelle est exprimée chez les rongeurs toutefois sa présence chez l'humain reste controversée. En effet, plusieurs études suggèrent que la caspase 4 constitue l'homologue humain de la caspase 12 (Bitko et Barik, 2001; Rao *et al.*, 2001; Szegezdi *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2007). Nous avons trouvé que les deux caspases peuvent être activées par l'acroléine dans les cellules humaines A549. L'activation de la caspase 12 a été rapportée dans plusieurs modèles cellulaires humains (cellules rénales embryonnaires HET 293, hépatocytes Hep 3B, cellules cervicales HeLa) incluant notre modèle A549 de cellules pulmonaires A549 (Bitko et Barik, 2001; Rao *et al.*, 2001; Szegezdi *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2007).

Une fois activées, les caspases 12 et 4 du RE sont libérées au niveau du cytosol où elles activent, par clivage protéolytique, les caspases 9 et 3 induisant ainsi l'apoptose indépendante de la voie mitochondriale (Hitomi *et al.*, 2004; Morishima *et al.*, 2002; Yukioka *et al.*, 2008). Afin de confirmer l'implication des caspases 12 et 4 dans la signalisation apoptotique induite par l'acroléine, nous avons étudié l'effet de leurs inhibitions sur la condensation de la chromatine, une étape de la phase d'exécution de la réponse apoptotique. Nos données indiquent que l'inhibition de ces deux caspases n'a pas un effet significatif sur l'apoptose induite par l'acroléine. Dans le cas de la caspase 4 il y a une inhibition partielle de l'apoptose. Ce résultat est surprenant puisque les caspases 12 et 4 sont activées dans ces conditions de traitement. Cette observation pourrait être due au fait que l'inhibition de ces

caspases initiatrices entraîne l'activation d'autres voies en aval du flux calcique et de l'activation des calpaïnes. En effet, les calpaïnes actives ainsi que le calcium peuvent propager le signal apoptotique indépendamment de l'activation des caspases 12 et 4 (Johnson, 2000 et Orrenius *et al.* 2003).

Les études précédentes montrent que le flux calcique induit par l'acroléine dans les macrophages est associé à l'augmentation de l'activité de l'enzyme xanthine oxydase qui génère des ROS via le processus de dégradation des bases puriques (O'Tool *et al.*, 2009). Il est connu qu'une accumulation des ROS dans la cellule peut déclencher le processus apoptotique par la voie mitochondriale en favorisant la perméabilisation de l'OMM ainsi que par la voie des récepteurs de mort via l'activation transcriptionnelle ou la stabilisation des récepteurs de mort et de leurs ligand (Ott *et al.*, 2007 ; Morgan *et al.*, 2007). D'ailleurs les études de notre laboratoire montrent que l'apoptose induite par l'acroléine dans les cellules A549 implique la génération des ROS (Roy *et al.*, 2009). Par ailleurs, le calcium libre peut également être absorbé par la mitochondrie ce qui provoque directement la perméabilisation de l'OMM et déclenche ainsi la voie mitochondriale de l'apoptose. Cette voie apoptotique peut également être déclenchée par les calpaïnes qui activent par clivage la protéine pro-apoptotique bid impliquée dans le mécanisme de perméabilisation de l'OMM (Mandi *et al.*, 2002 ; Chen *et al.*, 2001). Par conséquent, il est possible que la perte de l'homéostasie calcique causée par l'acroléine dans les cellules A549 déclenche ou amplifie le signal déclenché par la voie de récepteur de mort ainsi que par la voie mitochondriale de l'apoptose. D'ailleurs, les études de notre laboratoire ont montré que l'acroléine active la voie de récepteurs de mort ainsi que la voie mitochondriale dans les cellules CHO et dans les cellules pulmonaires A549 (Tanel et Averill-Bates, 2005 ; 2007a ; Roy *et al.*, 2009 ; 2010). Toutefois, des études subséquentes sont nécessaires afin de déterminer quelle voie est activée en premier. En effet, Thompson et Burcham (2008) ont montré que la libération du cyt c, dans les cellules A549 exposées à 100 μ M d'acroléine, se produit après 6 heures de traitement (Thompson et Burcham, 2008a,b). Dans ce cas, la voie du RE serait activée en amont de la voie mitochondriale. Par contre, les études effectuées dans notre laboratoire montrent que dans les cellules A549 la voie mitochondriale et la voie de récepteurs de mort sont activées entre 30 minutes et 2 heures de traitement avec l'acroléine (Roy *et al.*, 2009 ; 2010). Dans ce cas, la

voie de récepteur de mort et la voie mitochondriale sont induites avant la voie du RE. Des études subséquentes sont nécessaires afin de confirmer une interaction entre la voie du RE et les autres voies apoptotiques activées par l'acroléine dans les cellules A549.

Par ailleurs, il est connu que le calcium active des nucléases dépendantes du calcium au niveau du noyau qui pourraient participer, ensemble avec CAD, à la dégradation de l'ADN observée durant l'apoptose (Hughes *et al.*, 1998 ; Dong *et al.*, 2006). Également, les études précédentes montrent que le calcium et les calpaïnes sont impliqués dans la désintégration du cytosquelette ce qui aboutit au bourgeonnement de la membrane plasmatique qui se produit au cours de l'apoptose (Miyoshi *et al.*, 1996 ; Dong *et al.*, 2006).

En résumé, nos travaux indiquent que l'acroléine (25-200 μ M) est une substance nocive qui provoque la mort par apoptose des cellules A549. Notre étude montre que cette apoptose pourrait impliquer la voie du RE. Plus précisément, nous avons trouvé que l'acroléine est responsable de l'induction d'un stress du RE dans les cellules pulmonaires A549. De plus, ce stress du RE induit par l'acroléine est assez rigoureux pour déclencher la transduction du signal apoptotique par la voie du RE en induisant le facteur de transcription CHOP, probablement en augmentant le flux calcique et en activant les calpaïnes. L'acroléine peut également induire l'activation des caspases 12 et 4 toutefois l'apoptose induite par l'acroléine n'implique pas nécessairement leur activation dans les cellules A549. Notre étude n'exclut pas l'implication du calcium dans l'induction ou l'amplification d'autres voies apoptotiques. Des études subséquentes pourront clarifier d'autres rôles du calcium dans l'apoptose induite par l'acroléine.

Cette étude permet d'éclaircir davantage les mécanismes cellulaires impliqués dans la réponse cellulaire suite à une exposition d'acroléine qui est un polluant environnemental et un électrophile endogène. De plus, nos résultats sont pertinents pour l'évaluation des mécanismes impliqués dans le développement de plusieurs conditions pathologiques associées à l'acroléine plus spécifiquement les lésions de l'épithélium respiratoire causées par l'inhalation de la fumée de cigarette. Il est important de poursuivre la recherche sur les mécanismes de toxicité induite par l'acroléine puisque l'être humain est inévitablement

exposé à l'acroléine et cet aldéhyde toxique est impliqué dans plusieurs conditions pathologiques.

CHAPITRE V CONCLUSION

L'acroléine est un aldéhyde α,β -insaturé hautement toxique et réactif qui est présent dans les gaz d'échappement des véhicules, le smog et dans la fumée de cigarette (Kehrer et Biswal, 2000; Stevens et Maier, 2008). L'acroléine est également présente dans plusieurs aliments et sa concentration peut être augmentée dans la nourriture suite à la cuisson et la friture des aliments. L'acroléine peut également être générée de façon endogène durant la peroxydation des acides gras insaturés, des lipoprotéines ainsi qu'aux sites inflammatoires via l'oxydation de la thréonine (Anderson *et al.*, 1997; Uchida *et al.*, 1998a). Ainsi, l'implication de l'acroléine dans le développement de plusieurs conditions pathologiques est suspectée. En effet, des quantités élevées de protéines modifiées par l'acroléine ont été détectées dans les tissus atteints dans plusieurs conditions pathologiques, associées au stress oxydatif et à l'inflammation accrue, dont les maladies respiratoires et neurodégénératives, l'athérosclérose ainsi que l'insuffisance rénale (Leikauf *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 1999; Uchida, 1999). La présence ubiquitaire de l'acroléine dans l'environnement ainsi que son implication possible dans plusieurs pathologies expliquent l'importance de la recherche sur les mécanismes de toxicité de cette substance nocive.

Notre étude montre que l'acroléine (25-200 μ M) est une substance toxique qui induit l'apoptose par la voie du RE dans les cellules pulmonaires épithéliales A549. Plus précisément, l'acroléine induit un stress du RE et déclenche la signalisation UPR en activant les trois récepteurs sensibles au stress du RE, PERK, IRE1 α et ATF6 α . De plus, dans nos conditions de traitement avec l'acroléine (25-200 μ M, 2 heures), le stress du RE induit par l'acroléine est assez rigoureux pour initier la voie apoptotique médiée par le RE. Nos observations montrent que la voie apoptotique induite par l'acroléine implique l'induction du facteur de transcription CHOP, l'augmentation du taux de calcium libre intracellulaire qui est responsable de l'activation des calpaïnes qui à leur tour sont impliquées dans l'activation des caspases 12 et 4. Nous avons également montré que l'apoptose induite par l'acroléine dans les cellules A549 peut être atténuée par un traitement avec le chélateur de calcium BAPTA-AM et avec l'inhibiteur des calpaïnes mais pas avec les inhibiteurs des caspases 12 et 4. Plus

précisément, l'inhibition de la caspase 4 a inhibée partiellement (non significatif) l'apoptose induite par l'acroléine dans les cellules A549. Ceci suggère l'implication d'autres voies dans la transduction du signal apoptotique induit par l'acroléine dans les cellules pulmonaires A549.

Dans notre étude de toxicité de l'acroléine, nous avons employé les pneumocytes de type II qui sont connus pour jouer un rôle dans la régénération de l'épithélium alvéolaire suite à une lésion (Bates *et al.*, 2008; Foster *et al.*, 1998; Geiser, 2003). Il est connu que 90% de la surface alvéolaire est recouverte par les pneumocytes de type I qui sont des cellules différenciées. Toutefois, les cellules épithéliales de type II sont les progéniteurs des cellules de type I et elles sont plus nombreuses et plus résistantes aux agressions. Par ailleurs, il est également connu que l'acroléine est un constituant majeur de la fumée de cigarette (3 à 220 µg/cigarette) et la littérature rapporte que cette substance toxique est impliquée dans plusieurs pathologies associées au tabagisme (Feng *et al.*, 2006; Mercado et Jaimes, 2007; van der Toorn *et al.*, 2007). D'autres études montrent que la toxicité de l'acroléine, au niveau de l'épithélium respiratoire, pourrait être attribuée à sa capacité d'induire la mort apoptotique des cellules épithéliales bronchiques et des cellules épithéliales alvéolaires. Notre étude nous apprend une partie des nombreux mécanismes de toxicité de l'acroléine, un constituant majeur de la fumée de cigarette et un polluant omniprésent dans l'environnement. Nos résultats sont importants pour plusieurs domaines en santé humaine dont la toxicité associée à l'exposition à l'acroléine présente dans l'environnement et dans la fumée de tabac, la toxicité et/ou l'action thérapeutique du cyclophosphamide et de l'isofosfamide ainsi que le développement de maladies associées au stress oxydatif.

Il est indispensable de poursuivre la recherche dans ce domaine afin de mieux comprendre les effets toxiques de cette substance nocive pour la santé humaine. Comme travaux futures, il sera intéressant d'approfondir le rôle du calcium dans l'apoptose induite par l'acroléine. En effet, le calcium ainsi que les calpaïnes pourraient traduire le signal apoptotique en agissant au niveau de la mitochondrie en favorisant la perméabilisation de l'OMM. Dans le cas du calcium, l'étude du potentiel mitochondrial pourrait être effectuée en présence et en absence du chélateur de calcium BAPTA-AM dans les pneumocytes traités

avec l'acroléine. L'implication des calpaïnes dans la perméabilisation de l'OMM, quant à elles, pourrait être mise en évidence par l'observation d'une translocation de ces enzymes au niveau de la mitochondrie ainsi qu'en étudiant l'expression des protéines de la famille de Bcl-2, substrats connus de ces protéases. Les études précédentes de notre laboratoire montrent que l'apoptose induite par l'acroléine implique également la voie du récepteur de mort ainsi que la voie mitochondriale dans les cellules A549 (Roy *et al.*, 2009 ; 2010). Par conséquent, il sera pertinent d'étudier les interactions entre les trois voies apoptotiques et d'établir ainsi une chronologie d'événements dans la transduction et l'exécution de l'apoptose. L'étude de l'activation des trois voies apoptotiques en relation avec la concentration d'acroléine est également nécessaire. De plus, il sera intéressant d'étudier plus en profondeur le rôle de CHOP dans l'apoptose induite par l'acroléine. Ainsi, en transfectant les cellules avec l'ARN interférant de CHOP il sera possible de déterminer si l'inhibition de l'expression de CHOP inhibe l'activation des caspases et protège les cellules contre l'apoptose induite par l'acroléine.

Étant donné que l'acroléine induit le stress du RE, il est possible que cet agent toxique induise l'autophagie, un mécanisme de survie cellulaire. Les interactions entre l'autophagie et l'apoptose ne sont pas encore bien compris. Il sera intéressant d'étudier ces dernières en suivant l'expression des différentes protéines qui régulent les deux phénomènes dont le facteur de transcription eIF2 α phosphorylé.

Mise à part la compréhension des mécanismes de toxicité de l'acroléine, il faut également trouver des agents qui pourraient jouer un rôle protecteur contre les effets pro-apoptogène de l'acroléine. La littérature présente quelques exemples dont l'hydroxytyrosol (Liu *et al.*, 2007), l'acide α -lipoïque (Jia *et al.*, 2007) et le N-acétylcystéine (Tanel et Averill-Bates, 2007b). Ceci pourrait être utile pour contrer les effets secondaires associés à l'acroléine lors des traitements avec le cyclophosphamide, agent anti-cancéreux couramment employé. Étant donné qu'on ne connaît pas tout sur les effets toxiques de l'acroléine, il est important de continuer la recherche dans ce domaine de la toxicologie.

RÉFÉRENCES

- Adams, J.D., Jr., and Klaidman, L.K. (1993). "Acrolein-induced oxygen radical formation." Free Radic Biol Med 15, 187-193.
- Adibhatla, R.M., and Hatcher, J.F. (2008). "Phospholipase A(2), reactive oxygen species, and lipid peroxidation in CNS pathologies." BMB Rep 41, 560-567.
- Agence de la santé publique du Canada. (2007). "La vie et le souffle: Les maladies respiratoires au Canada", A.d.l.s.p.d. Canada ed. (Ottawa).
- Alarcon, R.A. (1976). "Studies on the in vivo formation of acrolein: 3-hydroxy-propylmercapturic acid as an index of cyclophosphamide (NSC-26271) activation." Cancer Treat Rep 60, 327-335.
- Alderton, W. K., Cooper, C. E., Knowles, R. G. (2001). "Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition." Biochem J 357, 593-615 .
- Allen, R.T., Hunter, W.J., 3rd, and Agrawal, D.K. (1997). "Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis." J Pharmacol Toxicol Methods 37, 215-228.
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., and Yuan, J. (1996). "Human ICE/CED-3 protease nomenclature." Cell 87, 171.
- Alvarez, J., Montero, M. (2002). "Measuring $[Ca^{2+}]$ in the endoplasmic reticulum with aequorin." Cell Calcium 32, 251-260.
- Anderson, M.M., Hazen, S.L., Hsu, F.F., and Heinecke, J.W. (1997). "Human neutrophils employ the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system to convert hydroxy-amino acids into glycolaldehyde, 2-hydroxypropanal, and acrolein. A mechanism for the generation of highly reactive alpha-hydroxy and alpha,beta-unsaturated aldehydes by phagocytes at sites of inflammation." J Clin Invest 99, 424-432.
- Arai, H., Uchida, K., and Nakamura, K. (2005). "Effect of ascorbate on acrolein modification of very low density lipoprotein and uptake of oxidized apolipoprotein E by hepatocytes." Biosci Biotechnol Biochem 69, 1760-1762.
- Arcavi, L., Benowitz, N.L. (2004). "Cigarette smoking and infection." Arch Intern Med 164, 2206-2216.
- Arikketh, D., Niranjali, S., and Devaraj, H. (2004). "Detection of acrolein-lysine adducts in plasma low-density lipoprotein and in aorta of cyclophosphamide-administered rats." Arch Toxicol 78, 397-401.

- Ashkenazi, A., and Dixit, V.M. (1998). "Death receptors: signaling and modulation." Science 281, 1305-1308.
- ATSDR (2007). "Toxicological profile for Acrolein" (Atlanta, U. S. Department of Health and Human Services, Public Health Service).
- Au, W., Sokova, O.I., Kopnin, B., and Arrighi, F.E. (1980). "Cytogenetic toxicity of cyclophosphamide and its metabolites in vitro." Cytogenet Cell Genet 26, 108-116.
- Bailey, D., and O'Hare, P. (2007). "Transmembrane bZIP transcription factors in ER stress signaling and the unfolded protein response." Antioxid Redox Signal 9, 2305-2321.
- Bao, Q., and Shi, Y. (2007). "Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases." Cell Death Differ 14, 56-65.
- Baranano, D.E., Rao, M., Ferris, C.D., Snyder, S.H. (2002). "Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant." Proc Natl Acad Sci U S A 99, 16093-16098.
- Barnhart, B.C., Alappat, E.C., and Peter, M.E. (2003). "The CD95 type I/type II model." Semin Immunol 15, 185-193.
- Bassik, M.C., Scorrano, L., Oakes, S.A., Pozzan, T., and Korsmeyer, S.J. (2004). "Phosphorylation of BCL-2 regulates ER Ca^{2+} homeostasis and apoptosis." EMBO J 23, 1207-1216.
- Bates, S.R., Kazi, A.S., Tao, J.Q., Yu, K.J., Gonder, D.S., Feinstein, S.I., and Fisher, A.B. (2008). "Role of P63 (CKAP4) in binding of surfactant protein-A to type II pneumocytes." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 295, L658-669.
- Beauchamp, R.O., Jr., Andjelkovich, D.A., Kligerman, A.D., Morgan, K.T., and Heck, H.D. (1985). "A critical review of the literature on acrolein toxicity." Crit Rev Toxicol 14, 309-380.
- Belizario, J.E., Alves, J., Occhiucci, J.M., Garay-Malpartida, M., and Sesso, A. (2007). "A mechanistic view of mitochondrial death decision pores." Braz J Med Biol Res 40, 1011-1024.
- Bernardi, P. (1999). "Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition." Physiol Rev 79, 1127-1155.
- Berry, K.A., Henson, P.M., Murphy, R.C. (2008). "Effects of Acrolein on Leukotriene Biosynthesis in Human Neutrophils." Chem Res Toxicol 21, 2424-2432.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P., and Ron, D. (2000). "Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response." Nat Cell Biol 2, 326-332.

- Bettaieb, A., and Averill-Bates, D.A. (2005). "Thermotolerance induced at a mild temperature of 40 degrees C protects cells against heat shock-induced apoptosis." J Cell Physiol 205, 47-57.
- Bettaieb, A. et Averill-Bates, D.A. (2009). "Thermotolerance induced at mild temperature of 40°C protects cells against heat shock-induced ER stress: Role of calcium in ER-mediated apoptosis." prêt pour une soumission.
- Bhardwaj, A., Aggarwal, B. B. (2003). " Receptor-Mediated Choreography of Life and Death." J Clinical Immunology 23, 317-332.
- Biswal, S., Acquaah-Mensah, G., Datta, K., Wu, X., and Kehrer, J.P. (2002). "Inhibition of cell proliferation and AP-1 activity by acrolein in human A549 lung adenocarcinoma cells due to thiol imbalance and covalent modifications." Chem Res Toxicol 15, 180-186.
- Bitko, V., and Barik, S. (2001). "An endoplasmic reticulum-specific stress-activated caspase (caspase-12) is implicated in the apoptosis of A549 epithelial cells by respiratory syncytial virus." J Cell Biochem 80, 441-454.
- Blankenberg, F.G. (2008). "In vivo detection of apoptosis." J Nucl Med 49 Suppl 2, 81S-95S.
- Blomgren, K., Zhu, C., Wang, X., Karlsson, J.O., Leverin, A.L., Bahr, B.A., Mallard, C., and Hagberg, H. (2001). "Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia: a mechanism of "pathological apoptosis"?" J Biol Chem 276, 10191-10198.
- Boehning, D., Patterson, R.L., Sedaghat, L., Glebova, N.O., Kurosaki, T., Snyder, S.H. (2003). "Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis." Nat Cell Biol 5, 1051-1061.
- Boatright, K.M., Renatus, M., Scott, F.L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I.M., Ricci, J.E., Edris, W.A., Sutherlin, D.P., Green, D.R., *et al.* (2003). "A unified model for apical caspase activation." Mol Cell 11, 529-541.
- Boatright, K.M., and Salvesen, G.S. (2003). "Mechanisms of caspase activation." Curr Opin Cell Biol 15, 725-731.
- Boor, P.J., Sanduja, R., Nelson, T.J., and Ansari, G.A. (1987). "In vivo metabolism of the cardiovascular toxin, allylamine." Biochem Pharmacol 36, 4347-4353.
- Borchers, M.T., Wesselkamper, S., Wert, S.E., Shapiro, S.D., and Leikauf, G.D. (1999). "Monocyte inflammation augments acrolein-induced Muc5ac expression in mouse lung." Am J Physiol 277, L489-497.

- Borchers, M.T., Wesselkamper, S.C., Eppert, B.L., Motz, G.T., Sartor, M.A., Tomlinson, C.R., Medvedovic, M., and Tichelaar, J.W. (2008). "Nonredundant functions of alphabeta and gammadelta T cells in acrolein-induced pulmonary pathology." Toxicol Sci 105, 188-199.
- Borchers, M.T., Wesselkamper, S.C., Harris, N.L., Deshmukh, H., Beckman, E., Vitucci, M., Tichelaar, J.W., and Leikauf, G.D. (2007). "CD8+ T cells contribute to macrophage accumulation and airspace enlargement following repeated irritant exposure." Exp Mol Pathol 83, 301-310.
- Boyce, M., and Yuan, J. (2006). "Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death." Cell Death Differ 13, 363-373.
- Bradford, M.M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem 72, 248-254.
- Bras, M., Queenan, B., and Susin, S.A. (2005). "Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying." Biochemistry (Mosc) 70, 231-239.
- Bratton, S.B., Walker, G., Srinivasula, S.M., Sun, X.M., Butterworth, M., Alnemri, E.S., and Cohen, G.M. (2001). "Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes." EMBO J 20, 998-1009.
- Brigelius-Flohe, R. (2006). "Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors." Biol Chem 387, 1329-1335.
- Burcham, P.C., Raso, A., Thompson, C., and Tan, D. (2007). "Intermolecular protein cross-linking during acrolein toxicity: efficacy of carbonyl scavengers as inhibitors of heat shock protein-90 cross-linking in A549 cells." Chem Res Toxicol 20, 1629-1637.
- Burchiel, S.W., Edwards, B.S., Kuckuck, F.W., Lauer, F.T., Prossnitz, E.R., Ransom, J.T., and Sklar, L.A. (2000). "Analysis of free intracellular calcium by flow cytometry: multiparameter and pharmacologic applications." Methods 21, 221-230.
- Butterfield, D.A., Castegna, A., Lauderback, C.M., and Drake, J. (2002). "Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death." Neurobiol Aging 23, 655-664.
- Calingasan, N.Y., Uchida, K., and Gibson, G.E. (1999). "Protein-bound acrolein: a novel marker of oxidative stress in Alzheimer's disease." J Neurochem 72, 751-756.
- Cande, C., Vahsen, N., Kouranti, I., Schmitt, E., Daugas, E., Spahr, C., Luban, J., Kroemer, R.T., Giordanetto, F., Garrido, C., Penninger, J.M., Kroemer, G. (2004). "AIF and cyclophilin A cooperate in apoptosis-associated chromatinolysis." Oncogene 23, 1514-1521.

- Carbone, D.L., Doorn, J.A., Kiebler, Z., and Petersen, D.R. (2005). "Cysteine modification by lipid peroxidation products inhibits protein disulfide isomerase." Chem Res Toxicol 18, 1324-1331.
- Carnevali, S., Nakamura, Y., Mio, T., Liu, X., Takigawa, K., Romberger, D.J., Spurzem, J.R., and Rennard, S.I. (1998). "Cigarette smoke extract inhibits fibroblast-mediated collagen gel contraction." Am J Physiol 274, L591-598.
- Carp, H., and Janoff, A. (1978). "Possible mechanisms of emphysema in smokers. In vitro suppression of serum elastase-inhibitory capacity by fresh cigarette smoke and its prevention by antioxidants." Am Rev Respir Dis 118, 617-621.
- Casella, I.G., and Contursi, M. (2004). "Quantitative analysis of acrolein in heated vegetable oils by liquid chromatography with pulsed electrochemical detection." J Agric Food Chem 52, 5816-5821.
- Chai, J., Wu, Q., Shiozaki, E., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., and Shi, Y. (2001). "Crystal structure of a procaspase-7 zymogen: mechanisms of activation and substrate binding." Cell 107, 399-407.
- Chaigne-Delalande, B., Moreau, J.F., and Legembre, P. (2008). "Rewinding the DISC." Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 56, 9-14.
- Chauhan, D., Li, G., Hideshima, T., Podar, K., Mitsiades, C., Mitsiades, N., Munshi, N., Kharbanda, S., and Anderson, K.C. (2003). "JNK-dependent release of mitochondrial protein, Smac, during apoptosis in multiple myeloma (MM) cells." J Biol Chem 278, 17593-17596.
- Chen, M., He, H., Zhan, S., Krajewski, S., Reed, J.C., and Gottlieb, R.A. (2001). "Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/reperfusion." J Biol Chem 276, 30724-30728.
- Chen, X., Shen, J., and Prywes, R. (2002). "The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi." J Biol Chem 277, 13045-13052.
- Chipuk, J.E., and Green, D.R. (2008). "How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization?" Trends Cell Biol 18, 157-164.
- Chowdhury, I., Tharakan, B., and Bhat, G.K. (2008). "Caspases - an update." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 151, 10-27.
- Chung, F.L., Young, R., and Hecht, S.S. (1984). "Formation of cyclic 1,N2-propanodeoxyguanosine adducts in DNA upon reaction with acrolein or crotonaldehyde." Cancer Res 44, 990-995.

- Clark, R.A. (1988). "Potential roles of fibronectin in cutaneous wound repair." Arch Dermatol 124, 201-206.
- Coleman, M.L., Sahai, E.A., Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A., and Olson, M.F. (2001). "Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I." Nat Cell Biol 3, 339-345.
- Corradi, M., Pignatti, P., Manini, P., Andreoli, R., Goldoni, M., Poppa, M., Moscato, G., Balbi, B., and Mutti, A. (2004). "Comparison between exhaled and sputum oxidative stress biomarkers in chronic airway inflammation." Eur Respir J 24, 1011-1017.
- Costa, D.L., Kutzman, R.S., Lehmann, J.R., and Drew, R.T. (1986). "Altered lung function and structure in the rat after subchronic exposure to acrolein." Am Rev Respir Dis 133, 286-291.
- Cox, J.S., Shamu, C.E., and Walter, P. (1993). "Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase." Cell 73, 1197-1206.
- Croall, D.E., and Ersfeld, K. (2007). "The calpains: modular designs and functional diversity." Genome Biol 8, 218-226.
- Croft, D.R., Coleman, M.L., Li, S., Robertson, D., Sullivan, T., Stewart, C.L., and Olson, M.F. (2005). "Actin-myosin-based contraction is responsible for apoptotic nuclear disintegration." J Cell Biol 168, 245-255.
- Cullinan, S.B., Gordan, J.D., Jin, J., Harper, J.W., and Diehl, J.A. (2004). "The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase." Mol Cell Biol 24, 8477-8486.
- Dalle-Donne, I., Milzani, A., Gagliano, N., Colombo, R., Giustarini, D., and Rossi, R. (2008). "Molecular mechanisms and potential clinical significance of S-glutathionylation." Antioxid Redox Signal 10, 445-473.
- Danielsen, P.H., Loft, S., and Moller, P. (2008). "DNA damage and cytotoxicity in type II lung epithelial (A549) cell cultures after exposure to diesel exhaust and urban street particles." Part Fibre Toxicol 5, 1-12.
- de los Santos, C., Zaliznyak, T., and Johnson, F. (2001). "NMR characterization of a DNA duplex containing the major acrolein-derived deoxyguanosine adduct gamma -OH-1, -N2-propano-2'-deoxyguanosine." J Biol Chem 276, 9077-9082.
- Demarchi, F., and Schneider, C. (2007). "The calpain system as a modulator of stress/damage response." Cell Cycle 6, 136-138.

- Dhanasekaran, D.N., and Reddy, E.P. (2008). "JNK signaling in apoptosis." *Oncogene* 27, 6245-6251.
- Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., and Kensler, T.W. (2005). "The role of Keap1 in cellular protective responses." *Chem Res Toxicol* 18, 1779-1791.
- Dong, J.-Z., Glass, J., and Moldoveanu, S. (2000). "A simple GC-MS technique for the analysis of vapor phase mainstream cigarette smoke." *J Microcolumn* 12, 145-152.
- Dong, Z., Saikumar, P., Weinberg, J.M., Venkatachalam, M.A. (2006). "Calcium in cell injury and death." *Annu Rev Pathol* 1, 405-434.
- Donovan, N., Becker, E.B., Konishi, Y., and Bonni, A. (2002). "JNK phosphorylation and activation of BAD couples the stress-activated signaling pathway to the cell death machinery." *J Biol Chem* 277, 40944-40949.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. (2000). "Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition." *Cell* 102, 33-42.
- Eger, K., Folkers, G., Zimmerman, W., Schmidt, R., and Hiller, W. (1987). "Unexpected formation of a heterocyclic spiran in the Michael reaction of ascorbic acid with acrolein." *J Chem Res Synopses* 9, 277.
- Eggler, A.L., Liu, G., Pezzuto, J.M., van Breemen, R.B., and Mesecar, A.D. (2005). "Modifying specific cysteines of the electrophile-sensing human Keap1 protein is insufficient to disrupt binding to the Nrf2 domain Neh2." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 10070-10075.
- Egle, J.L., Jr. (1972). "Retention of inhaled formaldehyde, propionaldehyde, and acrolein in the dog." *Arch Environ Health* 25, 119-124.
- Einhorn, I.N. (1975). "Physiological and toxicological aspects of smoke produced during the combustion of polymeric materials." *Environ Health Perspect* 11, 163-189.
- Eiserich, J.P., van der Vliet, A., Handelman, G.J., Halliwell, B., Cross, C.E. (1995). "Dietary antioxidants and cigarette smoke-induced biomolecular damage: a complex interaction." *Am J Clin Nutr* 62, 1490S-1500S.
- Eisler, R. (2000). "Handbook of Chemical Risk Assessment: Health Hazards to Humans, Plants, and Animals." Three Volume Set, Vol II, *Lewis Publishers*. CRC 1 edition. Santa-Clara, pp. 739-763.
- Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." *Toxicol Pathol* 35, 495-516.

- Environnement Canada. (2000). "Acroléine."
- Esterbauer, H., Schaur, R.J., and Zollner, H. (1991). "Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes." Free Radic Biol Med 11, 81-128.
- Ezzati, M., and Lopez, A.D. (2004). "Regional, disease specific patterns of smoking-attributable mortality in 2000." Tob Control 13, 388-395.
- Fadok, V.A., Bratton, D.L., Frasch, S.C., Warner, M.L., and Henson, P.M. (1998). "The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes." Cell Death Differ 5, 551-562.
- Farahani, R.M., Kloth, L.C. (2008). "The hypothesis of 'biophysical matrix contraction': wound contraction revisited." Int Wound J 5, 477-482.
- Faitova, J., Krekac, D., Hrstka, R., and Vojtesek, B. (2006). "Endoplasmic reticulum stress and apoptosis." Cell Mol Biol Lett 11, 488-505.
- Fan, M., and Chambers, T.C. (2001). "Role of mitogen-activated protein kinases in the response of tumor cells to chemotherapy." Drug Resist Updat 4, 253-267.
- Fan, T.J., Han, L.H., Cong, R.S., and Liang, J. (2005). "Caspase family proteases and apoptosis." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 37, 719-727.
- Farombi, E.O., Surh, Y.J. (2006). "Heme oxygenase-1 as a potential therapeutic target for hepatoprotection." J Biochem Mol Biol 39, 479-491.
- Faroon, O., Roney, N., Taylor, J., Ashizawa, A., Lumpkin, M.H., Plewak, D.J. (2008). "Acrolein environmental levels and potential for human exposure." Toxicology and Industrial Health 24, 543-564.
- Feissner, R. F., Skalska, J., Gaum, W. E., Sheu, S. S. (2009). "Crosstalk signaling between mitochondrial Ca^{2+} and ROS." Front Biosci 14, 1197-1218.
- Feng, Z., Hu, W., Hu, Y., and Tang, M.S. (2006). "Acrolein is a major cigarette-related lung cancer agent: Preferential binding at p53 mutational hotspots and inhibition of DNA repair." Proc Natl Acad Sci U S A 103, 15404-15409.
- Feron, V.J., Til, H.P., de Vrijer, F., Woutersen, R.A., Cassee, F.R., and van Bladeren, P.J. (1991). "Aldehydes: occurrence, carcinogenic potential, mechanism of action and risk assessment." Mutat Res 259, 363-385.
- Fink, S.L., and Cookson, B.T. (2005). "Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells." Infect Immun 73, 1907-1916.

- Finkelstein, E.I., Nardini, M., and van der Vliet, A. (2001). "Inhibition of neutrophil apoptosis by acrolein: a mechanism of tobacco-related lung disease?" Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 281, L732-739.
- Finkelstein, E.I., Ruben, J., Koot, C.W., Hristova, M., and van der Vliet, A. (2005). "Regulation of constitutive neutrophil apoptosis by the alpha,beta-unsaturated aldehydes acrolein and 4-hydroxynonenal." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 289, L1019-1028.
- Fischer, H., Koenig, U., Eckhart, L., and Tschachler, E. (2002). "Human caspase 12 has acquired deleterious mutations." Biochem Biophys Res Commun 293, 722-726.
- Fodor, G., Arnold, R., Mohacsi, T., Karle, I., and Flippen-Anderson, J. (1983). "A new role for L-ascorbic acid: Michael donor to alpha,beta-unsaturated carbonyl compounds." Tetrahedron 39, 2137-2145.
- Foller, M., Geiger, C., Mahmud, H., Nicolay, J., and Lang, F. (2008). "Stimulation of suicidal erythrocyte death by amantadine." Eur J Pharmacol 581, 13-18.
- Forbes, B., and Ehrhardt, C. (2005). "Human respiratory epithelial cell culture for drug delivery applications." Eur J Pharm Biopharm 60, 193-205.
- Foskett, J.K., White, C., Cheung, K.H., Mak, D.O. (2007). "Inositol trisphosphate receptor Ca^{2+} release channels." Physiol Rev 87, 593-658.
- Foster, K.A., Oster, C.G., Mayer, M.M., Avery, M.L., and Audus, K.L. (1998). "Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism." Exp Cell Res 243, 359-366.
- Fuchs, S.Y., Adler, V., Pincus, M.R., and Ronai, Z. (1998). "MEKK1/JNK signaling stabilizes and activates p53." Proc Natl Acad Sci U S A 95, 10541-10546.
- Fuentes-Prior, P., and Salvesen, G.S. (2004). "The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition." Biochem J 384, 201-232.
- Furlanut, M., and Franceschi, L. (2003). "Pharmacology of ifosfamide." Oncology 65 Suppl 2, 2-6.
- Furuhata, A., Ishii, T., Kumazawa, S., Yamada, T., Nakayama, T., and Uchida, K. (2003). "N(epsilon)-(3-methylpyridinium)lysine, a major antigenic adduct generated in acrolein-modified protein." J Biol Chem 278, 48658-48665.
- Furuhata, A., Nakamura, M., Osawa, T., and Uchida, K. (2002). "Thiolation of protein-bound carcinogenic aldehyde. An electrophilic acrolein-lysine adduct that covalently binds to thiols." J Biol Chem 277, 27919-27926.

- Gao, Y.T., Blot, W.J., Zheng, W., Ershow, A.G., Hsu, C.W., Levin, L.I., Zhang, R., Fraumeni, J.F. Jr. (1987). "Lung cancer among Chinese women." Int J Cancer 40, 604-609.
- Geiser, T. (2003). "Mechanisms of alveolar epithelial repair in acute lung injury--a translational approach." Swiss Med Wkly 133, 586-590.
- Ghilarducci, D.P., and Tjeerdema, R.S. (1995). "Fate and effects of acrolein." Rev Environ Contam Toxicol 144, 95-146.
- Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H., and Parks, W.P. (1973). "In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors." J Natl Cancer Inst 51, 1417-1423.
- Go, Y.M., Halvey, P.J., Hansen, J.M., Reed, M., Pohl, J., and Jones, D.P. (2007). "Reactive aldehyde modification of thioredoxin-1 activates early steps of inflammation and cell adhesion." Am J Pathol 171, 1670-1681.
- Gogvadze, V., and Zhivotovsky, B. (2007). "Alteration of mitochondrial function and cell sensitization to death." J Bioenerg Biomembr 39, 23-30.
- Golks, A., Brenner, D., Fritsch, C., Krammer, P.H., and Lavrik, I.N. (2005). "c-FLIPR, a new regulator of death receptor-induced apoptosis." J Biol Chem 280, 14507-14513.
- Gomez-Ramos, A., Diaz-Nido, J., Smith, M.A., Perry, G., and Avila, J. (2003). "Effect of the lipid peroxidation product acrolein on tau phosphorylation in neural cells." J Neurosci Res 71, 863-870.
- Görlach, A., Klappa, P., Kietzmann, T. (2006). "The endoplasmic reticulum: folding, calcium homeostasis, signaling, and redox control." Antioxid Redox Signal 8, 1391-1418.
- Grafstrom, R.C. (1990). "Carcinogenesis studies in human epithelial tissues and cells in vitro: emphasis on serum-free culture conditions and transformation studies." Acta Physiol Scand Suppl 592, 93-133.
- Grafstrom, R.C., Sundqvist, K., Dypbukt, J.M., and Harris, C.C. (1987). "Pathobiological effects of aldehydes in cultured human bronchial cells." IARC Sci Publ, 443-445.
- Grondin, M., Marion, M., DenizEAU, F., Averill-Bates, D.A. (2007). "Tributyltin induces apoptotic signaling in hepatocytes through pathways involving the endoplasmic reticulum and mitochondria." Toxicol Appl Pharmacol 1, 57-68.
- Green, D.R., and Kroemer, G. (2004). "The pathophysiology of mitochondrial cell death." Science 305, 626-629.

- Guay, J., Lambert, H., Gingras-Breton, G., Lavoie, J.N., Huot, J., and Landry, J. (1997). "Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27." J Cell Sci 110 (Pt 3), 357-368.
- Guerin, M., Higgins, C., and Jenkins, R. (1987). "Measuring environmental emissions from tobacco combustion: Sidestream cigarette smoke literature review." Atmos Environ 21, 291-297.
- Gugliucci, A. (2008). "Antithrombin activity is inhibited by acrolein and homocysteine thiolactone: Protection by cysteine." Life Sci 82, 413-418.
- Gugliucci, A., Lunceford, N., Kinugasa, E., Ogata, H., Schulze, J., and Kimura, S. (2007). "Acrolein inactivates paraoxonase 1: changes in free acrolein levels after hemodialysis correlate with increases in paraoxonase 1 activity in chronic renal failure patients." Clin Chim Acta 384, 105-112.
- Haberzettl, P., Vladykovskaya, E., Srivastava, S., and Bhatnagar, A. (2009). "Role of endoplasmic reticulum stress in acrolein-induced endothelial activation." Toxicol Appl Pharmacol 234, 14-24.
- Haidara, K., Marion, M., Gascon-Barre, M., Denizeau, F., and Averill-Bates, D.A. (2008). "Implication of caspases and subcellular compartments in tert-butylhydroperoxide induced apoptosis." Toxicol Appl Pharmacol 229, 65-76.
- Hamann, K., Durkes, A., Ouyang, H., Uchida, K., Pond, A., and Shi, R. (2008). "Critical role of acrolein in secondary injury following ex vivo spinal cord trauma." J Neurochem 107, 712-721.
- Hampton, M.B., and Orrenius, S. (1997). "Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis." FEBS Lett 414, 552-556.
- Harding, H.P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., and Ron, D. (2000). "Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells." Mol Cell 6, 1099-1108.
- Harding, H.P., Zhang, Y., and Ron, D. (1999). "Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase." Nature 397, 271-274.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P.D., Calton, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., *et al.* (2003). "An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress." Mol Cell 11, 619-633.
- Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2004). "Signaling to NF-kappaB." Genes Dev 18, 2195-2224.
- Hayden, M.S., West, A.P., and Ghosh, S. (2006). "NF-kappaB and the immune response." Oncogene 25, 6758-6780.

- Haze, K., Okada, T., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M., and Mori, K. (2001). "Identification of the G13 (cAMP-response-element-binding protein-related protein) gene product related to activating transcription factor 6 as a transcriptional activator of the mammalian unfolded protein response." Biochem J 355, 19-28.
- Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., and Mori, K. (1999). "Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress." Mol Biol Cell 10, 3787-3799.
- Hegde, R., Srinivasula, S.M., Zhang, Z., Wassell, R., Mukattash, R., Cilenti, L., DuBois, G., Lazebnik, Y., Zervos, A.S., Fernandes-Alnemri, T., *et al.* (2002). "Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction." J Biol Chem 277, 432-438.
- Hengstermann, A., Müller, T. (2008). "Endoplasmic reticulum stress induced by aqueous extracts of cigarette smoke in 3T3 cells activates the unfolded-protein-response-dependent PERK pathway of cell survival." Free Radic Biol Med 44, 1097-1107.
- Henriks-Eckerman, M.-L., Engström, B., and Aringhieri, E. (1990). "Thermal degradation products of steel protective paints." AIHA Journal 51, 241-244.
- Hetz, C.A. (2007). "ER stress signaling and the BCL-2 family of proteins: from adaptation to irreversible cellular damage." Antioxid Redox Signal 9, 2345-2355.
- Hitomi, J., Katayama, T., Eguchi, Y., Kudo, T., Taniguchi, M., Koyama, Y., Manabe, T., Yamagishi, S., Bando, Y., Imaizumi, K., *et al.* (2004). "Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death." J Cell Biol 165, 347-356.
- Hoet, P.H., and Nemery, B. (2000). "Polyamines in the lung: polyamine uptake and polyamine-linked pathological or toxicological conditions." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 278, L417-433.
- Hoffmann, D., Djordjevic, M.V., and Hoffmann, I. (1997). "The changing cigarette." Prev Med 26, 427-434.
- Hoffmann, D., Hoffmann, I., and El-Bayoumy, K. (2001). "The less harmful cigarette: a controversial issue. a tribute to Ernst L. Wynder." Chem Res Toxicol 14, 767-790.
- Hollien, J., and Weissman, J.S. (2006). "Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response." Science 313, 104-107.
- Horton, N.D., Biswal, S.S., Corrigan, L.L., Bratta, J., and Kehrer, J.P. (1999). "Acrolein causes inhibitor kappaB-independent decreases in nuclear factor kappaB activation in human lung adenocarcinoma (A549) cells." J Biol Chem 274, 9200-9206.

- Horton, N.D., Mamiya, B.M., and Kehrer, J.P. (1997). "Relationships between cell density, glutathione and proliferation of A549 human lung adenocarcinoma cells treated with acrolein." Toxicology 122, 111-122.
- Hoshino, Y., Mio, T., Nagai, S., Miki, H., Ito, I., Izumi, T. (2001). "Cytotoxic effects of cigarette smoke extract on an alveolar type II cell-derived cell line." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 281, 509-516.
- Hughes, F.M. Jr., Evans-Storms, R.B., Cidlowski, J.A. (1998). "Evidence that non-caspase proteases are required for chromatin degradation during apoptosis." Cell Death Differ 5, 1017-1027.
- Hyvelin, J.M., Roux, E., Prevost, M.C., Savineau, J.P., and Marthan, R. (2000). "Cellular mechanisms of acrolein-induced alteration in calcium signaling in airway smooth muscle." Toxicol Appl Pharmacol 164, 176-183.
- IARC. (1985). "Acrolein." IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum 36, 133-161.
- Igarashi, K., Ueda, S., Yoshida, K., and Kashiwagi, K. (2006). "Polyamines in renal failure." Amino Acids 31, 477-483.
- Illing, E.M.M., and Kaiserman, M.J. (2000). "La mortalité attribuable au tabagisme au Canada et dans ses régions, 1994 et 1996" Maladies chroniques au Canada 20, 123-130.
- Ishii, T., Yamada, T., Mori, T., Kumazawa, S., Uchida, K., and Nakayama, T. (2007). "Characterization of acrolein-induced protein cross-links." Free Radic Res 41, 1253-1260.
- Iwakoshi, N.N., Lee, A.H., Vallabhajosyula, P., Otipoby, K.L., Rajewsky, K., and Glimcher, L.H. (2003). "Plasma cell differentiation and the unfolded protein response intersect at the transcription factor XBP-1." Nat Immunol 4, 321-329.
- Iwawaki, T., Hosoda, A., Okuda, T., Kamigori, Y., Nomura-Furuwatari, C., Kimata, Y., Tsuru, A., and Kohno, K. (2001). "Translational control by the ER transmembrane kinase/ribonuclease IRE1 under ER stress." Nat Cell Biol 3, 158-164.
- Jakab, G.J. (1977). "Adverse effect of a cigarette smoke component, acrolein, on pulmonary antibacterial defenses and on viral-bacterial interactions in the lung." Am Rev Respir Dis 115, 33-38.
- Jeong, S.Y., and Seol, D.W. (2008). "The role of mitochondria in apoptosis." BMB Rep 41, 11-22.

- Ji, C., Kozak, K.R., and Marnett, L.J. (2001). "IkappaB kinase, a molecular target for inhibition by 4-hydroxy-2-nonenal." J Biol Chem 276, 18223-18228.
- Jia, L., Liu, Z., Sun, L., Miller, S.S., Ames, B.N., Cotman, C.W., and Liu, J. (2007). "Acrolein, a toxicant in cigarette smoke, causes oxidative damage and mitochondrial dysfunction in RPE cells: protection by (R)-alpha-lipoic acid." Invest Ophthalmol Vis Sci 48, 339-348.
- Jiang, C.C., Chen, L.H., Gillespie, S., Wang, Y.F., Kiejda, K.A., Zhang, X.D., and Hersey, P. (2007). "Inhibition of MEK sensitizes human melanoma cells to endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis." Cancer Res 67, 9750-9761.
- Jin, Z., and El-Deiry, W.S. (2005). "Overview of cell death signaling pathways." Cancer Biol Ther 4, 139-163.
- Jones, E.V., Dickman, M.J., and Whitmarsh, A.J. (2007). "Regulation of p73-mediated apoptosis by c-Jun N-terminal kinase." Biochem J 405, 617-623.
- Kaijser, G.P., Korst, A., Beijnen, J.H., Bult, A., and Underberg, W.J. (1993). "The analysis of ifosfamide and its metabolites (review)." Anticancer Res 13, 1311-1324.
- Karin, M., and Lin, A. (2002). "NF-kappaB at the crossroads of life and death." Nat Immunol 3, 221-227.
- Karki, P., Dahal, G.R., and Park, I.S. (2007). "Both dimerization and interdomain processing are essential for caspase-4 activation." Biochem Biophys Res Commun 356, 1056-1061.
- Kasahara, D.I., Poynter, M.E., Othman, Z., Hemenway, D., and van der Vliet, A. (2008). "Acrolein inhalation suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokine production but does not affect acute airways neutrophilia." J Immunol 181, 736-745.
- Kaushik, G., Kaushik, T., Khanduja, S., Pathak, C.M., and Khanduja, K.L. (2008). "Cigarette smoke condensate promotes cell proliferation through disturbance in cellular redox homeostasis of transformed lung epithelial type-II cells." Cancer Lett 270, 120-131.
- Kavurma, M.M., Tan, N.Y., and Bennett, M.R. (2008). "Death receptors and their ligands in atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol 28, 1694-1702.
- Kawanishi, M., Matsuda, T., Nakayama, A., Takebe, H., Matsui, S., and Yagi, T. (1998). "Molecular analysis of mutations induced by acrolein in human fibroblast cells using supF shuttle vector plasmids." Mutat Res 417, 65-73.
- Kehrer, J.P., and Biswal, S.S. (2000). "The molecular effects of acrolein." Toxicol Sci 57, 6-15.

- Kern, J.C., and Kehr, J.P. (2002). "Acrolein-induced cell death: a caspase-influenced decision between apoptosis and oncosis/necrosis." Chem Biol Interact 139, 79-95.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer 26, 239-257.
- Kharbanda, S., Saxena, S., Yoshida, K., Pandey, P., Kaneki, M., Wang, Q., Cheng, K., Chen, Y.N., Campbell, A., Sudha, T., *et al.* (2000). "Translocation of SAPK/JNK to mitochondria and interaction with Bcl-x(L) in response to DNA damage." J Biol Chem 275, 322-327.
- Kiechle, F.L., and Zhang, X. (2002). "Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications." Clin Chim Acta 326, 27-45.
- Kim, H.E., Du, F., Fang, M., and Wang, X. (2005). "Formation of apoptosome is initiated by cytochrome c-induced dATP hydrolysis and subsequent nucleotide exchange on Apaf-1." Proc Natl Acad Sci U S A 102, 17545-17550.
- Kischkel, F.C., Lawrence, D.A., Chuntharapai, A., Schow, P., Kim, K.J., and Ashkenazi, A. (2000). "Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5." Immunity 12, 611-620.
- Kischkel, F.C., Lawrence, D.A., Tinel, A., LeBlanc, H., Virmani, A., Schow, P., Gazdar, A., Blenis, J., Arnott, D., and Ashkenazi, A. (2001). "Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8." J Biol Chem 276, 46639-46646.
- Kitamura, M. (2008). "Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in renal pathophysiology: Janus faces." Am J Physiol Renal Physiol 295, F323-334.
- Klatt, P., and Lamas, S. (2000). "Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress." Eur J Biochem 267, 4928-4944.
- Klener, P., Jr., Andera, L., Klener, P., Necas, E., and Zivny, J. (2006). "Cell death signalling pathways in the pathogenesis and therapy of haematologic malignancies: overview of apoptotic pathways." Folia Biol (Praha) 52, 34-44.
- Kohno, K. (2007). "How transmembrane proteins sense endoplasmic reticulum stress." Antioxid Redox Signal 9, 2295-2303.
- Kozekov, I.D., Nechev, L.V., Moseley, M.S., Harris, C.M., Rizzo, C.J., Stone, M.P., and Harris, T.M. (2003). "DNA interchain cross-links formed by acrolein and crotonaldehyde." J Am Chem Soc 125, 50-61.

- Kozekov, I.D., Nechev, L.V., Sanchez, A., Harris, C.M., Lloyd, R.S., and Harris, T.M. (2001). "Interchain cross-linking of DNA mediated by the principal adduct of acrolein." Chem Res Toxicol 14, 1482-1485.
- Krantic, S., Mechawar, N., Reix, S., Quirion, R. (2007). "Apoptosis-inducing factor: a matter of neuron life and death." Progress in Neurobiology 81, 179-196.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., et al. (2008). "Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009." Cell Death Differ 16, 3-11.
- Kuhla, B., Haase, C., Flach, K., Luth, H.J., Arendt, T., and Munch, G. (2007). "Effect of pseudophosphorylation and cross-linking by lipid peroxidation and advanced glycation end product precursors on tau aggregation and filament formation." J Biol Chem 282, 6984-6991.
- Kurtz, A.J., and Lloyd, R.S. (2003). "1,N2-deoxyguanosine adducts of acrolein, crotonaldehyde, and trans-4-hydroxynonenal cross-link to peptides via Schiff base linkage." J Biol Chem 278, 5970-5976.
- Kwak, M.K., Kensler, T.W., and Casero, R.A., Jr. (2003). "Induction of phase 2 enzymes by serum oxidized polyamines through activation of Nrf2: effect of the polyamine metabolite acrolein." Biochem Biophys Res Commun 305, 662-670.
- Ladomenou, F., Kafatos, A., Galanakis, E. (2009). "Environmental tobacco smoke exposure as a risk factor for infections in infancy." Acta Paediatr 98, 1137-1141.
- Laemmli, U.K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature 227, 680-685.
- Lai, E., Teodoro, T., and Volchuk, A. (2007). "Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response." Physiology (Bethesda) 22, 193-201.
- Lai, W.L., Wong, N.S. (2008). "The PERK/eIF2 alpha signaling pathway of Unfolded Protein Response is essential for N-(4-hydroxyphenyl)retinamide (4HPR)-induced cytotoxicity in cancer cells." Exp Cell Res 314, 1667-1682.
- Lambert, C., Li, J., Jonscher, K., Yang, T.C., Reigan, P., Quintana, M., Harvey, J., and Freed, B.M. (2007). "Acrolein inhibits cytokine gene expression by alkylating cysteine and arginine residues in the NF-kappaB1 DNA binding domain." J Biol Chem 282, 19666-19675.
- Lambert, C., McCue, J., Portas, M., Ouyang, Y., Li, J., Rosano, T.G., Lazis, A., and Freed, B.M. (2005). "Acrolein in cigarette smoke inhibits T-cell responses." J Allergy Clin Immunol 116, 916-922.

- Lamkanfi, M., Festjens, N., Declercq, W., Vanden Berghe, T., and Vandenabeele, P. (2007). "Caspases in cell survival, proliferation and differentiation." Cell Death Differ 14, 44-55.
- Lauber, K., Bohn, E., Krober, S.M., Xiao, Y.J., Blumenthal, S.G., Lindemann, R.K., Marini, P., Wiedig, C., Zobywalski, A., Baksh, S., *et al.* (2003). "Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal." Cell 113, 717-730.
- Lee, A.H., Iwakoshi, N.N., and Glimcher, L.H. (2003). "XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response." Mol Cell Biol 23, 7448-7459.
- Lee, K.P., Dey, M., Neculai, D., Cao, C., Dever, T.E., and Sicheri, F. (2008). "Structure of the dual enzyme Ire1 reveals the basis for catalysis and regulation in nonconventional RNA splicing." Cell 132, 89-100.
- Lee, Y., and Shacter, E. (1997). "Bcl-2 does not protect Burkitt's lymphoma cells from oxidant-induced cell death." Blood 89, 4480-4492.
- Lees, P.S. (1995). "Combustion products and other firefighter exposures." Occup Med 10, 691-706.
- Lei, K., and Davis, R.J. (2003). "JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A 100, 2432-2437.
- Leikauf, G.D., Borchers, M.T., Prows, D.R., and Simpson, L.G. (2002). "Mucin apoprotein expression in COPD." Chest 121, 166S-182S.
- Li, J., and Yuan, J. (2008). "Caspases in apoptosis and beyond." Oncogene 27, 6194-6206.
- Li, L., Hamilton, R.F., Jr., and Holian, A. (1999). "Effect of acrolein on human alveolar macrophage NF-kappaB activity." Am J Physiol 277, L550-557.
- Li, L., Hamilton, R.F., Jr., Taylor, D.E., and Holian, A. (1997). "Acrolein-induced cell death in human alveolar macrophages." Toxicol Appl Pharmacol 145, 331-339.
- Li, L., and Holian, A. (1998). "Acrolein: a respiratory toxin that suppresses pulmonary host defense." Rev Environ Health 13, 99-108.
- Lieber, M., Smith, B., Szakal, A., Nelson-Rees, W., and Todaro, G. (1976). "A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells." Int J Cancer 17, 62-70.

- Lipari, F., and Swarin, S. (1982). "Determination of formaldehyde and other aldehydes in automobile exhaust with an improved 2,4-dinitrophenylhydrazine method." J Chromatogr 247, 297-306.
- Liu-Snyder, P., McNally, H., Shi, R., and Borgens, R.B. (2006). "Acrolein-mediated mechanisms of neuronal death." J Neurosci Res 84, 209-218.
- Liu, X., Li, P., Widlak, P., Zou, H., Luo, X., Garrard, W.T., and Wang, X. (1998). "The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A 95, 8461-8466.
- Liu, X.W., and Sok, D.E. (2004). "Inactivation of protein disulfide isomerase by alkylators including alpha,beta-unsaturated aldehydes at low physiological pHs." Biol Chem 385, 633-637.
- Liu, Z., Sun, L., Zhu, L., Jia, X., Li, X., Jia, H., Wang, Y., Weber, P., Long, J., and Liu, J. (2007). "Hydroxytyrosol protects retinal pigment epithelial cells from acrolein-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction." J Neurochem 103, 2690-2700.
- LoPachin, R.M., and Barber, D.S. (2006). "Synaptic cysteine sulfhydryl groups as targets of electrophilic neurotoxicants." Toxicol Sci 94, 240-255.
- LoPachin, R.M., Barber, D.S., and Gavin, T. (2008). "Molecular mechanisms of the conjugated alpha,beta-unsaturated carbonyl derivatives: relevance to neurotoxicity and neurodegenerative diseases." Toxicol Sci 104, 235-249.
- Lopachin, R.M., Barber, D.S., Geohagen, B.C., Gavin, T., He, D., and Das, S. (2007). "Structure-toxicity analysis of type-2 alkenes: in vitro neurotoxicity." Toxicol Sci 95, 136-146.
- Lopez-Anton, N., Rudy, A., Barth, N., Schmitz, M.L., Pettit, G.R., Schulze-Osthoff, K., Dirsch, V.M., and Vollmar, A.M. (2006). "The marine product cephalostatin 1 activates an endoplasmic reticulum stress-specific and apoptosome-independent apoptotic signaling pathway." J Biol Chem 281, 33078-33086.
- Lovat, P.E., Corazzari, M., Armstrong, J.L., Martin, S., Pagliarini, V., Hill, D., Brown, A.M., Piacentini, M., Birch-Machin, M.A., Redfern, C.P. (2008). "Increasing melanoma cell death using inhibitors of protein disulfide isomerases to abrogate survival responses to endoplasmic reticulum stress." Cancer Res 68, 5363-5369.
- Lovell, M.A., Xie, C., and Markesbery, W.R. (2000). "Acrolein, a product of lipid peroxidation, inhibits glucose and glutamate uptake in primary neuronal cultures." Free Radic Biol Med 29, 714-720.

- Lovell, M.A., Xie, C., and Markesbery, W.R. (2001). "Acrolein is increased in Alzheimer's disease brain and is toxic to primary hippocampal cultures." *Neurobiol Aging* 22, 187-194.
- Luo, J., Robinson, J.P., Shi, R. (2005). "Acrolein-induced cell death in PC12 cells: role of mitochondria-mediated oxidative stress." *Neurochem Int* 47, 449-457.
- Luo, J., Uchida, K., and Shi, R. (2005). "Accumulation of acrolein-protein adducts after traumatic spinal cord injury." *Neurochem Res* 30, 291-295.
- Luthi, A.U., and Martin, S.J. (2007). "The CASBAH: a searchable database of caspase substrates." *Cell Death Differ* 14, 641-650.
- Luthra, S., Dong, J., Gramajo, A.L., Chwa, M., Kim, D.W., Neekhara, A., Kuppermann, B.D., Kenney, M.C. (2008). "7-Ketocholesterol activates caspases-3/7, -8, and -12 in human microvascular endothelial cells in vitro." *Microvasc Res* 75, 343-50.
- Ma, Y., Brewer, J.W., Diehl, J.A., and Hendershot, L.M. (2002). "Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response." *J Mol Biol* 318, 1351-1365.
- Mackay, D., Shiu, W.Y., Ma, K.C. (1995). "Illustrated handbook of physical-chemical properties and environmental fate for organic chemicals". Boca Raton, FL, Lewis Publishers.
- Mandic, A., Hansson, J., Linder, S., and Shoshan, M.C. (2003). "Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling." *J Biol Chem* 278, 9100-9106.
- Mandic, A., Viktorsson, K., Strandberg, L., Heiden, T., Hansson, J., Linder, S., Shoshan, M.C. (2002). "Calpain-mediated Bid cleavage and calpain-independent Bak modulation: two separate pathways in cisplatin-induced apoptosis." *Mol Cell Biol* 22, 3003-3013.
- Marciniak, S.J., Yun, C.Y., Oyadomari, S., Novoa, I., Zhang, Y., Jungreis, R., Nagata, K., Harding, H.P., and Ron, D. (2004). "CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum." *Genes Dev* 18, 3066-3077.
- Martin, S.J., Finucane, D.M., Amarante-Mendes, G.P., O'Brien, G.A., and Green, D.R. (1996). "Phosphatidylserine externalization during CD95-induced apoptosis of cells and cytoplasts requires ICE/CED-3 protease activity." *J Biol Chem* 271, 28753-28756.
- Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Jurgensmeier, J.M., Susin, S.A., Vieira, H.L., Prevost, M.C., Xie, Z., Matsuyama, S., Reed, J.C., *et al.* (1998). "Bax and adenine nucleotide

- translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis." Science 281, 2027-2031.
- Materna, B.L., Jones, J.R., Sutton, P.M., Rothman, N., and Harrison, R.J. (1992). "Occupational exposures in California wildland fire fighting." Am Ind Hyg Assoc J 53, 69-76.
- Mathai, J.P., Germain, M., and Shore, G.C. (2005). "BH3-only BIK regulates BAX, BAK-dependent release of Ca²⁺ from endoplasmic reticulum stores and mitochondrial apoptosis during stress-induced cell death." J Biol Chem 280, 23829-23836.
- Matsuzawa, A., Nishitoh, H., Tobiume, K., Takeda, K., and Ichijo, H. (2002). "Physiological roles of ASK1-mediated signal transduction in oxidative stress- and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: advanced findings from ASK1 knockout mice." Antioxid Redox Signal 4, 415-425.
- McBride, H.M., Neuspiel, M., and Wasiak, S. (2006). "Mitochondria: more than just a powerhouse." Curr Biol 16, R551-560.
- McCullough, K.D., Martindale, J.L., Klotz, L.O., Aw, T.Y., and Holbrook, N.J. (2001). "Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state." Mol Cell Biol 21, 1249-1259.
- McDiarmid, M.A., Iype, P.T., Kolodner, K., Jacobson-Kram, D., Strickland, P.T. (1991). "Evidence for acrolein-modified DNA in peripheral blood leukocytes of cancer patients treated with cyclophosphamide." Mutat Res. 248, 93-99.
- Mercado, C., and Jaimes, E.A. (2007). "Cigarette smoking as a risk factor for atherosclerosis and renal disease: novel pathogenic insights." Curr Hypertens Rep 9, 66-72.
- Merksamer, P.I., Trusina, A., Papa, F.R. (2008). "Real-time redox measurements during endoplasmic reticulum stress reveal interlinked protein folding functions." Cell 135, 933-947.
- Mileva, S. (1976). "On the mechanism of the depressor reaction upon afferent vagal stimulation in cats. II. Role of the beta-adrenergic structures for the development of the depressor reaction." Acta Physiol Pharmacol Bulg 2, 30-38.
- Min, S.K., Lee, S.K., Park, J.S., Lee, J., Paeng, J.Y., Lee, S.I., Lee, H.J., Kim, Y., Pae, H.O., Lee, S.K., Kim, E.C. (2008). "Endoplasmic reticulum stress is involved in hydrogen peroxide induced apoptosis in immortalized and malignant human oral keratinocytes." J Oral Pathol Med 37, 490-498.
- Minko, I.G., Yamanaka, K., Kozekov, I.D., Kozekova, A., Indiani, C., O'Donnell, M.E., Jiang, Q., Goodman, M.F., Rizzo, C.J., and Lloyd, R.S. (2008). "Replication bypass

- of the acrolein-mediated deoxyguanine DNA-peptide cross-links by DNA polymerases of the DinB family." *Chem Res Toxicol* 10, 1983-1990.
- Mio, T., Romberger, D.J., Thompson, A.B., Robbins, R.A., Heires, A., and Rennard, S.I. (1997). "Cigarette smoke induces interleukin-8 release from human bronchial epithelial cells." *Am J Respir Crit Care Med* 155, 1770-1776.
- Misonou, Y., Asahi, M., Yokoe, S., Miyoshi, E., and Taniguchi, N. (2006). "Acrolein produces nitric oxide through the elevation of intracellular calcium levels to induce apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: implications for smoke angiopathy." *Nitric Oxide* 14, 180-187.
- Mitomo, K., Nakayama, K., Fujimoto, K., Sun, X., Seki, S., and Yamamoto, K. (1994). "Two different cellular redox systems regulate the DNA-binding activity of the p50 subunit of NF-kappa B in vitro." *Gene* 145, 197-203.
- Miyoshi, H., Umeshita, K., Sakon, M., Imajoh-Ohmi, S., Fujitani, K., Gotoh, M., Oiki, E., Kambayashi, J., Monden, M. (1996). "Calpain activation in plasma membrane bleb formation during tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatocyte injury." *Gastroenterology* 110, 1897-1904.
- Morgan, M.J., Kim, Y.S., Liu, Z. (2007). "Lipid rafts and oxidative stress-induced cell death." *Antioxid Redox Signal* 9, 1471-1483.
- Mori, K., Ma, W., Gething, M.J., and Sambrook, J. (1993). "A transmembrane protein with a cdc2+/CDC28-related kinase activity is required for signaling from the ER to the nucleus." *Cell* 74, 743-756.
- Morishima, N., Nakanishi, K., Takenouchi, H., Shibata, T., and Yasuhiko, Y. (2002). "An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12." *J Biol Chem* 277, 34287-34294.
- Nakagawa, T., and Yuan, J. (2000). "Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis." *J Cell Biol* 150, 887-894.
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B.A., and Yuan, J. (2000). "Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta." *Nature* 403, 98-103.
- Nakamura, Y., Romberger, D.J., Tate, L., Ertl, R.F., Kawamoto, M., Adachi, Y., Mio, T., Sisson, J.H., Spurzem, J.R., Rennard, S.I. (1995). "Cigarette smoke inhibits lung fibroblast proliferation and chemotaxis." *Am J Respir Crit Care Med* 151, 1497-1503.
- Nardini, M., Finkelstein, E.I., Reddy, S., Valacchi, G., Traber, M., Cross, C.E., and van der Vliet, A. (2002). "Acrolein-induced cytotoxicity in cultured human bronchial

- epithelial cells. Modulation by alpha-tocopherol and ascorbic acid." *Toxicology* 170, 173-185.
- Nath, R.G., Ocando, J.E., and Chung, F.L. (1996). "Detection of 1, N2-propanodeoxyguanosine adducts as potential endogenous DNA lesions in rodent and human tissues." *Cancer Res* 56, 452-456.
- Nath, R.G., Ocando, J.E., Guttenplan, J.B., and Chung, F.L. (1998). "1,N2-propanodeoxyguanosine adducts: potential new biomarkers of smoking-induced DNA damage in human oral tissue." *Cancer Res* 58, 581-584.
- Natusch, D.F. (1978). "Potentially carcinogenic species emitted to the atmosphere by fossil-fueled power plants." *Environ Health Perspect* 22, 79-90.
- Nazaroff, W.W., and Singer, B.C. (2004). "Inhalation of hazardous air pollutants from environmental tobacco smoke in US residences." *J Expo Anal Environ Epidemiol* 14 Suppl 1, S71-77.
- Nicholson, D.W. (1999). "Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death." *Cell Death Differ* 6, 1028-1042.
- Nieuwdorp, M., Stoes, E.S., Meijers, J.C., and Buller, H. (2005). "Hypercoagulability in the metabolic syndrome." *Curr Opin Pharmacol* 5, 155-159.
- Nishikawa, H., Hayakawa, T., and Sakai, T. (1987). "Determination of acrolein and crotonaldehyde in automobile exhaust gas by gas chromatography with electron-capture detection." *Analyst* 112, 859-862.
- Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K., Inoue, K., Hori, S., Kakizuka, A., and Ichijo, H. (2002). "ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats." *Genes Dev* 16, 1345-1355.
- Nunoshiba, T., and Yamamoto, K. (1999). "Role of glutathione on acrolein-induced cytotoxicity and mutagenicity in Escherichia coli." *Mutat Res* 442, 1-8.
- Oda, T., Kosuge, Y., Arakawa, M., Ishige, K., and Ito, Y. (2008). "Distinct mechanism of cell death is responsible for tunicamycin-induced ER stress in SK-N-SH and SH-SY5Y cells." *Neurosci Res* 60, 29-39.
- Oda, Y., Okada, T., Yoshida, H., Kaufman, R.J., Nagata, K., and Mori, K. (2006). "Derlin-2 and Derlin-3 are regulated by the mammalian unfolded protein response and are required for ER-associated degradation." *J Cell Biol* 172, 383-393.
- Okada, T., Yoshida, H., Akazawa, R., Negishi, M., and Mori, K. (2002). "Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein

- kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response." *Biochem J* 366, 585-594.
- Oleinik, N.V., Krupenko, N.I., and Krupenko, S.A. (2007). "Cooperation between JNK1 and JNK2 in activation of p53 apoptotic pathway." *Oncogene* 26, 7222-7230.
- Oram, J.F. (2003). "HDL apolipoproteins and ABCA1: partners in the removal of excess cellular cholesterol." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 720-727.
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B., and Nicotera, P. (2003). "Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link." *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 552-565.
- Osburn, W.O., and Kensler, T.W. (2008). "Nrf2 signaling: an adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults." *Mutat Res* 659, 31-39.
- O'Toole, T.E., Zheng, Y.T., Hellmann, J., Conklin, D.J., Barski, O., Bhatnagar, A. (2009). "Acrolein activates matrix metalloproteinases by increasing reactive oxygen species in macrophages." *Toxicol Appl Pharmacol* 236, 194-201.
- Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S., Zhivotovsky, B. (2007). "Mitochondria, oxidative stress and cell death." *Apoptosis* 12, 913-922.
- Ow, Y.P., Green, D.R., Hao, Z., and Mak, T.W. (2008). "Cytochrome c: functions beyond respiration." *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 532-542.
- Oyadomari, S., and Mori, M. (2004). "Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress." *Cell Death Differ* 11, 381-389.
- Palop, J.J., Chin, J., and Mucke, L. (2006). "A network dysfunction perspective on neurodegenerative diseases." *Nature* 443, 768-773.
- Parent, R.A., Caravello, H.E., and San, R.H. (1996a). "Mutagenic activity of acrolein in *S. typhimurium* and *E. coli*." *J Appl Toxicol* 16, 103-108.
- Parent, R.A., Caravello, H.E., and Sharp, D.E. (1996b). "Metabolism and distribution of [2,3-¹⁴C]acrolein in Sprague-Dawley rats." *J Appl Toxicol* 16, 449-457.
- Parent, R.A., Paust, D.E., Schrimpf, M.K., Talaat, R.E., Doane, R.A., Caravello, H.E., Lee, S.J., and Sharp, D.E. (1998). "Metabolism and distribution of [2,3-¹⁴C]acrolein in Sprague-Dawley rats. II. Identification of urinary and fecal metabolites." *Toxicol Sci* 43, 110-120.
- Park, S.M., Hu, S., Lee, T.H., and Yang, X. (2008). "Ubiquitination mediated by inhibitor of apoptosis proteins." *Methods Enzymol* 446, 225-235.

- Park, Y.S., Kim, J., Misonou, Y., Takamiya, R., Takahashi, M., Freeman, M.R., Taniguchi, N. (2007). "Acrolein induces cyclooxygenase-2 and prostaglandin production in human umbilical vein endothelial cells: roles of p38 MAP kinase." Arterioscler Thromb Vasc Biol 27, 1319-1325.
- Park, Y.S., and Taniguchi, N. (2008). "Acrolein induces inflammatory response underlying endothelial dysfunction: a risk factor for atherosclerosis." Ann N Y Acad Sci 1126, 185-189.
- Patel, J.M., Wood, J.C., and Leibman, K.C. (1980). "The biotransformation of allyl alcohol and acrolein in rat liver and lung preparations." Drug Metab Dispos 8, 305-308.
- Pawlowicz, A.J., Munter, T., Zhao, Y., and Kronberg, L. (2006). "Formation of acrolein adducts with 2'-deoxyadenosine in calf thymus DNA." Chem Res Toxicol 19, 571-576.
- Pedersen, P.L. (1999). "Mitochondrial events in the life and death of animal cells: a brief overview." J Bioenerg Biomembr 31, 291-304.
- Pfeifer, G.P., Denissenko, M.F., Olivier, M., Tretyakova, N., Hecht, S.S., and Hainaut, P. (2002). "Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers." Oncogene 21, 7435-7451.
- Pinton, P., Rimessi, A., Romagnoli, A., Prandini, A., Rizzuto, R. (2007). "Biosensors for the detection of calcium and pH." Methods Cell Biol 80, 297-325.
- Pohl, A., Lage, H., Müller, P., Pomorski, T., Herrmann, A. (2002). "Transport of phosphatidylserine via MDR1 (multidrug resistance 1) P-glycoprotein in a human gastric carcinoma cell line." Biochem J 365, 259-268.
- Potts, W., Lederer, T., and Quast, J. (1978). "A study of the inhalation toxicity of smoke produced upon pyrolysis and combustion of polyethylene foams. Part I. Laboratory studies." J Combust Toxicol 5, 408-433.
- Puthalakath, H., O'Reilly, L.A., Gunn, P., Lee, L., Kelly, P.N., Huntington, N.D., Hughes, P.D., Michalak, E.M., McKimm-Breschkin, J., Motoyama, N., *et al.* (2007). "ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim." Cell 129, 1337-1349.
- Romsicki, Y., Sharom, F.J. (2001). "Phospholipid flippase activity of the reconstituted P-glycoprotein multidrug transporter." Biochemistry 40, 6937-6947.
- Rao, R.V., Hermel, E., Castro-Obregon, S., del Rio, G., Ellerby, L.M., Ellerby, H.M., and Bredesen, D.E. (2001). "Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation." J Biol Chem 276, 33869-33874.

- Rao, R.V., Peel, A., Logvinova, A., del Rio, G., Hermel, E., Yokota, T., Goldsmith, P.C., Ellerby, L.M., Ellerby, H.M., and Bredesen, D.E. (2002). "Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone GRP78." FEBS Lett 514, 122-128.
- Reddy, R.K., Mao, C., Baumeister, P., Austin, R.C., Kaufman, R.J., and Lee, A.S. (2003). "Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation." J Biol Chem 278, 20915-20924.
- Rehm, J., Baliunas, D., Brochu, S., Fischer, B., Gnam, W., Patra, J., Popova, S., Sarnocinska-Hart, A., and Taylor, B. (2006). "Les coûts de l'abus de substances au Canada 2002." I.C.c.d.l.c.l.a.e.l. toxicomanies, ed. Ottawa.
- Renatus, M., Stennicke, H.R., Scott, F.L., Liddington, R.C., and Salvesen, G.S. (2001). "Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9." Proc Natl Acad Sci U S A 98, 14250-14255.
- Riedl, S.J., Fuentes-Prior, P., Renatus, M., Kairies, N., Krapp, S., Huber, R., Salvesen, G.S., and Bode, W. (2001a). "Structural basis for the activation of human procaspase-7." Proc Natl Acad Sci U S A 98, 14790-14795.
- Riedl, S.J., Renatus, M., Schwarzenbacher, R., Zhou, Q., Sun, C., Fesik, S.W., Liddington, R.C., and Salvesen, G.S. (2001b). "Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP." Cell 104, 791-800.
- Riedl, S.J., and Salvesen, G.S. (2007). "The apoptosome: signalling platform of cell death." Nat Rev Mol Cell Biol 8, 405-413.
- Roggen, E.L., Soni, N.K., and Verheyen, G.R. (2006). "Respiratory immunotoxicity: an in vitro assessment." Toxicol In Vitro 20, 1249-1264.
- Ron, D., and Habener, J.F. (1992). "CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription." Genes Dev 6, 439-453.
- Ron, D., and Hubbard, S.R. (2008). "How IRE1 reacts to ER stress." Cell 132, 24-26.
- Ron, D., and Walter, P. (2007). "Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response." Nat Rev Mol Cell Biol 8, 519-529.
- Ross, D., Kepa, J. K., Winski, S.L., Beall, H.D., Anwar, A., Siegel, D. (2000). "NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms." Chem Biol Interact 129, 77-97.

- Rossi, A., Kapahi, P., Natoli, G., Takahashi, T., Chen, Y., Karin, M., and Santoro, M.G. (2000). "Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of IkappaB kinase." *Nature* 403, 103-108.
- Roy, J., Palapati, P., Bettaieb, A., Tanel, A., Averill-Bates, D.A. (2009). "Acrolein induces a cellular stress response and triggers mitochondrial apoptosis in A549 cells." *Chemico-Biological Interactions* 181, 154-167.
- Roy, J., Palapati, P., Bettaieb, A., Averill-Bates, D. A. (2010). " A549 cells undergo apoptosis through the death receptor pathway upon exposure to acrolein: role of p53." In press, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*.
- Roy, S., Sharom, J.R., Houde, C., Loisel, T.P., Vaillancourt, J.P., Shao, W., Saleh, M., and Nicholson, D.W. (2008). "Confinement of caspase-12 proteolytic activity to autoprocesing." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 4133-4138.
- Sakata, K., Kashiwagi, K., Sharmin, S., Ueda, S., Irie, Y., Murotani, N., and Igarashi, K. (2003). "Increase in putrescine, amine oxidase, and acrolein in plasma of renal failure patients." *Biochem Biophys Res Commun* 305, 143-149.
- Samali, A., Cai, J., Zhivotovsky, B., Jones, D.P., Orrenius, S. (1999). "Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells." *EMBO J* 18, 2040-8.
- Sanchez, A.M., Minko, I.G., Kurtz, A.J., Kanuri, M., Moriya, M., and Lloyd, R.S. (2003). "Comparative evaluation of the bioreactivity and mutagenic spectra of acrolein-derived alpha-HOPdG and gamma-HOPdG regioisomeric deoxyguanosine adducts." *Chem Res Toxicol* 16, 1019-1028.
- Santé Canada. (2005). "Enqu te de surveillance de l'usage du tabac au Canada."
- Saraste, A., and Pulkki, K. (2000). "Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis." *Cardiovasc Res* 45, 528-537.
- Sasaki, T., Kikuchi, T., Yumoto, N., Yoshimura, N., Murachi, T. (1984). "Comparative specificity and kinetic studies on porcine calpain I and calpain II with naturally occurring peptides and synthetic fluorogenic substrates." *J Biol Chem* 259, 12489-12494.
- Satoh, K., Yamada, S., Koike, Y., Igarashi, Y., Toyokuni, S., Kumano, T., Takahata, T., Hayakari, M., Tsuchida, S., and Uchida, K. (1999). "A 1-hour enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of acrolein- and hydroxynonenal-modified proteins by epitope-bound casein matrix method." *Anal Biochem* 270, 323-328.
- Schafer, F.Q., and Buettner, G.R. (2001). "Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple." *Free Radic Biol Med* 30, 1191-1212.

- Scheuner, D., Song, B., McEwen, E., Liu, C., Laybutt, R., Gillespie, P., Saunders, T., Bonner-Weir, S., and Kaufman, R.J. (2001). "Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis." Mol Cell 7, 1165-1176.
- Schlegel, R.A., and Williamson, P. (2007). "P.S. to PS (phosphatidylserine)--pertinent proteins in apoptotic cell clearance." Sci STKE 408, 1-3.
- Schroder, M. (2006). "The unfolded protein response." Mol Biotechnol 34, 279-290.
- Schroder, M., and Kaufman, R.J. (2005). "The mammalian unfolded protein response." Annu Rev Biochem 74, 739-789.
- Schwerdt, G., Gordjani, N., Benesic, A., Freudinger, R., Wollny, B., Kirchhoff, A., and Gekle, M. (2006). "Chloroacetaldehyde- and acrolein-induced death of human proximal tubule cells." Pediatr Nephrol 21, 60-67.
- Seidler, N.W., Craig, H.D., and Squire, T.J. (2006). "Endogenous plastic composite material in the Alzheimer's brain." Med Hypotheses 67, 467-470.
- Seidler, N.W., and Squire, T.J. (2005). "Abeta-polyacrolein aggregates: novel mechanism of plastic formation in senile plaques." Biochem Biophys Res Commun 335, 501-504.
- Seiner, D.R., LaButti, J.N., and Gates, K.S. (2007). "Kinetics and mechanism of protein tyrosine phosphatase 1B inactivation by acrolein." Chem Res Toxicol 20, 1315-1320.
- Seizinger, D., and Dimitriades, B. (1972). "Oxygenates in exhaust from simple hydrocarbon fuels." J Air Pollut Control Assoc 22, 47-51.
- Shaffer, A.L., Shapiro-Shelef, M., Iwakoshi, N.N., Lee, A.H., Qian, S.B., Zhao, H., Yu, X., Yang, L., Tan, B.K., Rosenwald, A., *et al.* (2004). "XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation." Immunity 21, 81-93.
- Shamoto-Nagai, M., Maruyama, W., Hashizume, Y., Yoshida, M., Osawa, T., Riederer, P., and Naoi, M. (2007). "In parkinsonian substantia nigra, alpha-synuclein is modified by acrolein, a lipid-peroxidation product, and accumulates in the dopamine neurons with inhibition of proteasome activity." J Neural Transm 114, 1559-1567.
- Shao, B., Fu, X., McDonald, T.O., Green, P.S., Uchida, K., O'Brien, K.D., Oram, J.F., and Heinecke, J.W. (2005a). "Acrolein impairs ATP binding cassette transporter A1-dependent cholesterol export from cells through site-specific modification of apolipoprotein A-I." J Biol Chem 280, 36386-36396.

- Shao, B., O'Brien K, D., McDonald, T.O., Fu, X., Oram, J.F., Uchida, K., and Heinecke, J.W. (2005b). "Acrolein modifies apolipoprotein A-I in the human artery wall." Ann N Y Acad Sci 1043, 396-403.
- Shen, J., Chen, X., Hendershot, L., and Prywes, R. (2002). "ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals." Dev Cell 3, 99-111.
- Shibue, T., Suzuki, S., Okamoto, H., Yoshida, H., Ohba, Y., Takaoka, A., and Taniguchi, T. (2006). "Differential contribution of Puma and Noxa in dual regulation of p53-mediated apoptotic pathways." EMBO J 25, 4952-4962.
- Shields, P.G., Xu, G.X., Blot, W.J., Fraumeni, J.F., Jr., Trivers, G.E., Pellizzari, E.D., Qu, Y.H., Gao, Y.T., and Harris, C.C. (1995). "Mutagens from heated Chinese and U.S. cooking oils." J Natl Cancer Inst 87, 836-841.
- Shimizu, S., Eguchi, Y., Kamiike, W., Funahashi, Y., Mignon, A., Lacronique, V., Matsuda, H., and Tsujimoto, Y. (1998). "Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux." Proc Natl Acad Sci U S A 95, 1455-1459.
- Shimizu, S., Narita, M., and Tsujimoto, Y. (1999). "Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC." Nature 399, 483-487.
- Siegel, D., Bolton, E.M., Burr, J.A., Liebler, D.C., Ross, D. (1997). "The reduction of alpha-tocopherolquinone by human NAD(P)H: quinone oxidoreductase: the role of alpha-tocopherolhydroquinone as a cellular antioxidant." Mol Pharmacol 52, 300-305.
- Sies, H., and Jones, D. (2007). "Oxidative stress." In Encyclopedia of Stress, F.G. Elsevier, ed. (Academic Press), pp. 45-48.
- Smith, D.J., Ng, H., Kluck, R.M., and Nagley, P. (2008). "The mitochondrial gateway to cell death." IUBMB Life 60, 383-389.
- Smith, R.A., Cohen, S.M., and Lawson, T.A. (1990). "Acrolein mutagenicity in the V79 assay." Carcinogenesis 11, 497-498.
- Sok, J., Wang, X.Z., Batchvarova, N., Kuroda, M., Harding, H., and Ron, D. (1999). "CHOP-Dependent stress-inducible expression of a novel form of carbonic anhydrase VI." Mol Cell Biol 19, 495-504.
- Stadtman, E.R., and Levine, R.L. (2000). "Protein oxidation." Ann N Y Acad Sci 899, 191-208.
- Stennicke, H.R., and Salvesen, G.S. (1997). "Biochemical characteristics of caspases-3, -6, -7, and -8." J Biol Chem 272, 25719-25723.

- Stevens, J.F., and Maier, C.S. (2008). "Acrolein: sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease." Mol Nutr Food Res 52, 7-25.
- Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A.F., Glazer, A.N., Ames, B.N. (1987). "Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance." Science 235, 43-46.
- Stone, M.P., Cho, Y.J., Huang, H., Kim, H.Y., Kozekov, I.D., Kozekova, A., Wang, H., Minko, I.G., Lloyd, R.S., Harris, T.M., *et al.* (2008). "Interstrand DNA cross-links induced by alpha,beta-unsaturated aldehydes derived from lipid peroxidation and environmental sources." Acc Chem Res 41, 793-804.
- Suzuki, K., Hata, S., Kawabata, Y., Sorimachi, H. (2004). "Structure, activation, and biology of calpain." Diabetes 53, S12-S18.
- Suzuki, D., *et al.* Miyata, T. (1999). "Carbonyl stress in the pathogenesis of diabetic nephropathy." Intern Med 38, 309-314.
- Suzuki, D., Miyata, T., Saotome, N., Horie, K., Inagi, R., Yasuda, Y., Uchida, K., Izuhara, Y., Yagame, M., Sakai, H., *et al.* (1999). "Immunohistochemical evidence for an increased oxidative stress and carbonyl modification of proteins in diabetic glomerular lesions." J Am Soc Nephrol 10, 822-832.
- Szegezdi, E., Duffy, A., O'Mahoney, M.E., Logue, S.E., Mylotte, L.A., O'brien, T., Samali, A. (2006). "ER stress contributes to ischemia-induced cardiomyocyte apoptosis." Biochem Biophys Res Commun 349, 1406-1411.
- Szegezdi, E., Fitzgerald, U., and Samali, A. (2003). "Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far." Ann N Y Acad Sci 1010, 186-194.
- Szegezdi, E., Logue, S.E., Gorman, A.M., and Samali, A. (2006). "Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis." EMBO Rep 7, 880-885.
- Tait, J.F. (2008). "Imaging of apoptosis." J Nucl Med 49, 1573-1576.
- Takahashi, R., Deveraux, Q., Tamm, I., Welsh, K., Assa-Munt, N., Salvesen, G.S., and Reed, J.C. (1998). "A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases." J Biol Chem 273, 7787-7790.
- Takeda, K., Noguchi, T., Naguro, I., and Ichijo, H. (2008). "Apoptosis signal-regulating kinase 1 in stress and immune response." Annu Rev Pharmacol Toxicol 48, 199-225.
- Takeuchi, K., Kato, M., Suzuki, H., Akhand, A.A., Wu, J., Hossain, K., Miyata, T., Matsumoto, Y., Nimura, Y., and Nakashima, I. (2001). "Acrolein induces activation of the epidermal growth factor receptor of human keratinocytes for cell death." J Cell Biochem 81, 679-688.

- Talanian, R.V., Quinlan, C., Trautz, S., Hackett, M.C., Mankovich, J.A., Banach, D., Ghayur, T., Brady, K.D., Wong, W.W. (1997). "Substrate specificities of caspase family proteases." J Biol Chem 272, 9677-9682.
- Talhout, R., Opperhuizen, A., and van Amsterdam, J.G. (2006). "Sugars as tobacco ingredient: Effects on mainstream smoke composition." Food Chem Toxicol 44, 1789-1798.
- Tamamizu-Kato, S., Wong, J.Y., Jairam, V., Uchida, K., Raussens, V., Kato, H., Ruyschaert, J.M., and Narayanaswami, V. (2007). "Modification by acrolein, a component of tobacco smoke and age-related oxidative stress, mediates functional impairment of human apolipoprotein E." Biochemistry 46, 8392-8400.
- Tanel, A., and Averill-Bates, D.A. (2005). "The aldehyde acrolein induces apoptosis via activation of the mitochondrial pathway." Biochim Biophys Acta 1743, 255-267.
- Tanel, A., and Averill-Bates, D.A. (2007a). "Activation of the death receptor pathway of apoptosis by the aldehyde acrolein." Free Radic Biol Med 42, 798-810.
- Tanel, A., and Averill-Bates, D.A. (2007b). "Inhibition of acrolein-induced apoptosis by the antioxidant N-acetylcysteine." J Pharmacol Exp Ther 321, 73-83.
- Tanel, A., and Averill-Bates, D.A. (2007c). "P38 and ERK mitogen-activated protein kinases mediate acrolein-induced apoptosis in Chinese hamster ovary cells." Cell Signal 19, 968-977.
- Tauzon, E.C., Alvarado, A., Aschmann, S. M., Atkinson, R., Arey, J. (1999). "Product of the gas-phase reactions of 1,3-butadiene with OH and NO₃ Radicals." Environ Sci Technol 33, 3586-3595.
- Thomas, L.R., Stillman, D.J., and Thorburn, A. (2002). "Regulation of Fas-associated death domain interactions by the death effector domain identified by a modified reverse two-hybrid screen." J Biol Chem 277, 34343-34348.
- Thompson, C.A., and Burcham, P.C. (2008a). "Genome-wide transcriptional responses to acrolein." Chem Res Toxicol 21, 2245-2256.
- Thompson, C.A., and Burcham, P.C. (2008b). "Protein alkylation, transcriptional responses and cytochrome c release during acrolein toxicity in A549 cells: influence of nucleophilic culture media constituents." Toxicol In Vitro 22, 844-853.
- Timm, R., Kaiser, R., Lotsch, J., Heider, U., Sezer, O., Weisz, K., Montemurro, M., Roots, I., and Cascorbi, I. (2005). "Association of cyclophosphamide pharmacokinetics to polymorphic cytochrome P450 2C19." Pharmacogenomics J 5, 365-373.
- Timmer, J.C., and Salvesen, G.S. (2007). "Caspase substrates." Cell Death Differ 14, 66-72.

- Tirasophon, W., Welihinda, A.A., and Kaufman, R.J. (1998). "A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells." Genes Dev 12, 1812-1824.
- Tirumalai, R., Rajesh Kumar, T., Mai, K.H., and Biswal, S. (2002). "Acrolein causes transcriptional induction of phase II genes by activation of Nrf2 in human lung type II epithelial (A549) cells." Toxicol Lett 132, 27-36.
- Toledano, M.B., and Leonard, W.J. (1991). "Modulation of transcription factor NF-kappa B binding activity by oxidation-reduction in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A 88, 4328-4332.
- Tonks, N.K. (2003). "PTP1B: from the sidelines to the front lines!" FEBS Lett 546, 140-148.
- Trachootham, D., Lu, W., Ogasawara, M.A., Nilsa, R.D., and Huang, P. (2008). "Redox regulation of cell survival." Antioxid Redox Signal 10, 1343-1374.
- Tsujimoto, Y., and Shimizu, S. (2007). "Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death." Apoptosis 12, 835-840.
- Uchida, K. (1999). "Current status of acrolein as a lipid peroxidation product." Trends Cardiovasc Med 9, 109-113.
- Uchida, K. (2003). "4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress." Prog Lipid Res 42, 318-343.
- Uchida, K., Kanematsu, M., Morimitsu, Y., Osawa, T., Noguchi, N., and Niki, E. (1998a). "Acrolein is a product of lipid peroxidation reaction. Formation of free acrolein and its conjugate with lysine residues in oxidized low density lipoproteins." J Biol Chem 273, 16058-16066.
- Uchida, K., Kanematsu, M., Sakai, K., Matsuda, T., Hattori, N., Mizuno, Y., Suzuki, D., Miyata, T., Noguchi, N., Niki, E., *et al.* (1998b). "Protein-bound acrolein: potential markers for oxidative stress." Proc Natl Acad Sci U S A 95, 4882-4887.
- Urano, F., Bertolotti, A., and Ron, D. (2000a). "IRE1 and efferent signaling from the endoplasmic reticulum." J Cell Sci 113, 3697-3702.
- Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H.P., and Ron, D. (2000b). "Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1." Science 287, 664-666.
- USDOHAH Services. (2006). "Priority Data Needs for Acrolein."

- Vainiotalo, S., and Matveinen, K. (1993). "Cooking fumes as a hygienic problem in the food and catering industries." AIHA J 54, 376 - 382.
- Valacchi, G., Pagnin, E., Phung, A., Nardini, M., Schock, B.C., Cross, C.E., and van der Vliet, A. (2005). "Inhibition of NFkappaB activation and IL-8 expression in human bronchial epithelial cells by acrolein." Antioxid Redox Signal 7, 25-31.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., and Telser, J. (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." Int J Biochem Cell Biol 39, 44-84.
- Valmiki, M.G., and Ramos, J.W. (2008). "Death effector domain-containing proteins." Cell Mol Life Sci 66, 814-830.
- van Engeland, M., Nieland, L.J., Ramaekers, F.C., Schutte, B., Reutelingsperger, C.P. (1998). "Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure." Cytometry 31, 1-9.
- Van der Toorn, M., Smit-de Vries, M.P., Slebos, D.J., de Bruin, H.G., Abello, N., van Oosterhout, A.J., Bischoff, R., and Kauffman, H.F. (2007). "Cigarette smoke irreversibly modifies glutathione in airway epithelial cells." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 293, L1156-1162.
- Van Gorp, M., Festjens, N., van Loo, G., Saelens, X., and Vandenabeele, P. (2003). "Mitochondrial intermembrane proteins in cell death." Biochem Biophys Res Commun 304, 487-497.
- VanderVeen, L.A., Hashim, M.F., Nechev, L.V., Harris, T.M., Harris, C.M., and Marnett, L.J. (2001). "Evaluation of the mutagenic potential of the principal DNA adduct of acrolein." J Biol Chem 276, 9066-9070.
- Vattem, K.M., and Wek, R.C. (2004). "Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells." Proc Natl Acad Sci U S A 101, 11269-11274.
- Wajant, H. (2003). "Death receptors." Essays Biochem 39, 53-71.
- Wang, H.G., Pathan, N., Ethell, I.M., Krajewski, S., Yamaguchi, Y., Shibasaki, F., McKeon, F., Bobo, T., Franke, T.F., and Reed, J.C. (1999). "Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD." Science 284, 339-343.
- Wang, X.Z., Harding, H.P., Zhang, Y., Jolicoeur, E.M., Kuroda, M., and Ron, D. (1998). "Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses." EMBO J 17, 5708-5717.

- Wang, Y., Shen, J., Arenzana, N., Tirasophon, W., Kaufman, R.J., and Prywes, R. (2000). "Activation of ATF6 and an ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response." *J Biol Chem* 275, 27013-27020.
- Wheatly, M., Zhang, Z., Weil, J., Rogers, J., and Stiner, L. (2001). "Novel subcellular and molecular tools to study Ca^{2+} transport mechanisms during the elusive moulting stages of crustaceans: flow cytometry and polyclonal antibodies." *J Exp Biol* 204, 959-966.
- WHO. (2002). "Acrolein." W.H. Organization, ed.
- WHO (2008). "WHO Report on the Global Tobacco Epidemic" (Geneva).
- Williams, T.I., Lynn, B.C., Markesbery, W.R., and Lovell, M.A. (2006). "Increased levels of 4-hydroxynonenal and acrolein, neurotoxic markers of lipid peroxidation, in the brain in Mild Cognitive Impairment and early Alzheimer's disease." *Neurobiol Aging* 27, 1094-1099.
- Wilson, M.R., Stone, V., Cullen, R.T., Searl, A., Maynard, R.L., and Donaldson, K. (2000). "In vitro toxicology of respirable Montserrat volcanic ash." *Occup Environ Med* 57, 727-733.
- Woo, K.M., Chung, W.J., Ha, D.B., Goldberg, A.L., Chung, C.H. (1989). "Protease Ti from *Escherichia coli* requires ATP hydrolysis for protein breakdown but not for hydrolysis of small peptides." *J Biol Chem* 264, 2088-2091.
- Wrzal, P.K., Bettaieb, A., Averill-Bates, D.A. (2008). "Molecular mechanisms of apoptosis activation by heat shock in multidrug-resistant Chinese hamster cells." *Radiat Res* 170, 498-511.
- Wu, C.C., Hsieh, C.W., Lai, P.H., Lin, J.B., Liu, Y.C., and Wung, B.S. (2006). "Upregulation of endothelial heme oxygenase-1 expression through the activation of the JNK pathway by sublethal concentrations of acrolein." *Toxicol Appl Pharmacol* 214, 244-252.
- Wu, H.Y., Tomizawa, K., and Matsui, H. (2007). "Calpain-calcineurin signaling in the pathogenesis of calcium-dependent disorder." *Acta Med Okayama* 61, 123-137.
- Xu, C., Bailly-Maitre, B., and Reed, J.C. (2005). "Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions." *J Clin Invest* 115, 2656-2664.
- Yamaguchi, H., and Wang, H.G. (2004). "CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells." *J Biol Chem* 279, 45495-45502.

- Yamamoto, K., Ichijo, H., and Korsmeyer, S.J. (1999). "BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M." *Mol Cell Biol* 19, 8469-8478.
- Yang, I.Y., Chan, G., Miller, H., Huang, Y., Torres, M.C., Johnson, F., and Moriya, M. (2002). "Mutagenesis by acrolein-derived propanodeoxyguanosine adducts in human cells." *Biochemistry* 41, 13826-13832.
- Yang, I.Y., Hossain, M., Miller, H., Khullar, S., Johnson, F., Grollman, A., and Moriya, M. (2001). "Responses to the major acrolein-derived deoxyguanosine adduct in Escherichia coli." *J Biol Chem* 276, 9071-9076.
- Yang, J.K., Wang, L., Zheng, L., Wan, F., Ahmed, M., Lenardo, M.J., and Wu, H. (2005). "Crystal structure of MC159 reveals molecular mechanism of DISC assembly and FLIP inhibition." *Mol Cell* 20, 939-949.
- Yang, X., Ma, J.K., Malanga, C.J., and Rojanasakul, Y. (2000). "Characterization of proteolytic activities of pulmonary alveolar epithelium." *Int J Pharm* 195, 93-101.
- Yang, X., Wu, X., Choi, Y.E., Kern, J.C., and Kehrer, J.P. (2004). "Effect of acrolein and glutathione depleting agents on thioredoxin." *Toxicology* 204, 209-218.
- Yoneda, T., Imaizumi, K., Oono, K., Yui, D., Gomi, F., Katayama, T., and Tohyama, M. (2001). "Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress." *J Biol Chem* 276, 13935-13940.
- Yoshida, H. (2007a). "ER stress and diseases." *FEBS J* 274, 630-658.
- Yoshida, H. (2007b). "Unconventional splicing of XBP-1 mRNA in the unfolded protein response." *Antioxid Redox Signal* 9, 2323-2333.
- Yoshida, H., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., and Mori, K. (1998). "Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors." *J Biol Chem* 273, 33741-33749.
- Yoshida, H., Matsui, T., Hosokawa, N., Kaufman, R.J., Nagata, K., and Mori, K. (2003). "A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response." *Dev Cell* 4, 265-271.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., and Mori, K. (2001). "XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor." *Cell* 107, 881-891.

- Youle, R.J., and Strasser, A. (2008). "The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death." Nat Rev Mol Cell Biol 9, 47-59.
- Youn, H.D., Sun, L., Prywes, R., and Liu, J.O. (1999). "Apoptosis of T cells mediated by Ca^{2+} -induced release of the transcription factor MEF2." Science 286, 790-793.
- Yukioka, F., Matsuzaki, S., Kawamoto, K., Koyama, Y., Hitomi, J., Katayama, T., and Tohyama, M. (2008). "Presenilin-1 mutation activates the signaling pathway of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis." Neurochem Int 52, 683-687.
- Zhang, H., Forman, H.J. (2008). "Acrolein induces heme oxygenase-1 through PKC-delta and PI3K in human bronchial epithelial cells." Am J Respir Cell Mol Biol 38, 483-490.
- Zhang, L., Lai, E., Teodoro, T., Volchuk, A. (2009). "GRP78, but Not Protein-disulfide Isomerase, Partially Reverses Hyperglycemia-induced Inhibition of Insulin Synthesis and Secretion in Pancreatic {beta}-Cells." J Biol Chem 284, 5289-5298.
- Zhang, J., Patel, J.M., Block, E.R. (1998). "Hypoxia-specific upregulation of calpain activity and gene expression in pulmonary artery endothelial cells." Am J Physiol 275, L461-468.
- Zhao, X., Sun, Y., Yu, H., Ye, L., Zhang, L., Lu, J., Yuan, Y., Qian, G., and Ge, S. (2007). "Apoptosis induced by BIK was decreased with RNA interference of caspase-12." Biochem Biophys Res Commun 359, 896-901.
- Zhu, C., Wang, X., Deinum, J., Huang, Z., Gao, J., Modjtahedi, N., Neagu, M. R., Nilsson, M., Eriksson, P.S., Hagberg, H., Luban, J., roemer, G., Blomgren, K. (2007). "Cyclophilin A participates in the nuclear translocation of apoptosis-inducing factor in neurons after cerebral hypoxia-ischemia." J Exp Med 204, 1741-1748.
- Zong, W.X., Li, C., Hatzivassiliou, G., Lindsten, T., Yu, Q.C., Yuan, J., and Thompson, C.B. (2003). "Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis." J Cell Biol 162, 59-69.
- Zou, H., Li, Y., Liu, X., and Wang, X. (1999). "An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9." J Biol Chem 274, 11549-11556.